

Vol. 20, No. 1

JULY, 1934

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARI-YAMA, Niigata; KIKO GOTO, KYOTO; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUYE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka, TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYE-YOSHI, Tokyo, MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP  
501  
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

*Reprinted by*  
**TOA BOOK EXPORTS, INC.**

Tokyo Kosho Kaikan Building  
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo  
CABLE: Toaperiodical, Tokyo  
PHONE: Tokyo 291-1448



THE JOURNAL  
OF  
BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARI-YAMA, Niigata; KIKO GOTO, KYOTO; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUYE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYE-YOSHI, Tokyo, MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME 20

TOKYO

1934

**COPYRIGHT 1934**

**BY**

**THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**

**PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**

## CONTENTS TO VOLUME 20.

No. 1, July, 1934.

Page

MAKINO, Hiroshi. Der Einfluss der Temperatur auf den Eiweissstoffwechsel. III. Hexonbasen der Krötenleber während der Winterzeit....	1
ISHIDA, Inao. Über den Calcium- und Phosphorstoffwechsel. II. Einfluss des Carotins und Gallosterins auf den Kalk- sowie Phosphorgehalt des Blutes .....	5
III. Einfluss des Carotins auf den Kalkgehalt in Organen und Geweben	17
YAMAMOTO, Ichiro. Studies on biological reduction. V. The specificity of laetic acid dehydrogenase .....	23
OKII, Isokichi. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese der Phenolschwefelsäure im tierischen Organismus .....	31
OKII, Isokichi. Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXX. Einfluss der Gallensäure auf die Glykogenbildung aus den Fettsäuren in der Leber .....	37
KAWADA, Yutaka. Der Einfluss der Gallensäure auf die Salzauscheidung in der Lebergalle. IV. Ammoniakausscheidung in der Galle bei Zufuhr von Gallensäure .....	43
V. Über die Alkalienausscheidung in der Galle .....	51
OHASHI, Kaname. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. XXXI. Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Hypophysenextrakt und Cholsäure .....	59
UCHINO, Toyoo. Untersuchungen über den partiellen Abbau des Seidenfibroins .....	65
TOMIYAMA, Tetsuo and SHIGEMATSU, Shinobu. The rate of liberation of amino acids and ammonia in tryptic hydrolysis .....	131
MATSUI, Jujiro. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente .....	141
SHIMADA, Jitsuechi. Studies in experimental scurvy. XIX. Observations on urinary excretion of laetic acid of scorbutic guinea pigs and on laetic acid content in the blood .....	147
HIRADE, Junkichiro. Über die Reduktionspotentiale der organischen Verbindungen .....	161

No. 2, September, 1934.

SAKAI, Tadawo. Studies on biological reduction. VI. The oxidation of sugar by striated and heart muscles of fowls fed on polished rice and the behavior of adrenal cortex .....	193
---	-----

VII. On the oxidation of lactic acid in the heart muscle of vitamin-B deficient fowls .....	205
MIYAZAKI, Torazo. Biochemical studies on carbohydrates. V. A micro method for quantitative estimation of chondroitin sulfuric acid in cartilage .....	211
VI. The quantitative observation of chondroitinsulfuric acid in cartilage and bone .....	223
KAWABE, Kinji. Biochemical studies on carbohydrates. VII. On an enzyme which disintegrates glucosamine .....	233
VIII. The distribution of glucosamine among tissues when it is administered into the animal body subcutaneously or parenterally, and its renal threshold .....	243
IKEDA, Goichi. Die chemische Untersuchungen des Darmes. I. Mitteilung. Chemische Untersuchung des Darmsaftes .....	253
II. Mitteilung. Durchblutungsversuche des Darmes mit Harnstoff .....	261
III. Mitteilung. Durchblutungsversuch des Darmes mit Glykokoll .....	271
IV. Mitteilung. Durchblutungsversuche des Dünndarmes mit d-Alanin .....	279
MIYAZAKI, Torazo. Biochemical studies on carbohydrates. IX. On the fermentation of chondroitinsulfuric acid by <i>B. pyocyanus</i> and on pyocyanine .....	287
KAWABE, Kinji. Biochemical studies on carbohydrates. X. The fate of glucosamine in the animal body .....	293
MASAMUNE, Hajime. Biochemical studies on carbohydrates. XI. On the constitution of benzoylglucuronie acid and the enzyme which hydrolyses this compound .....	311
OHASHI, Kaname. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. (XXXII). Glykogenbildung der Leber und das Ph des Harns von hungernden Kaninchen unter Einfluss von Gallensäure .....	319
NAKAGAWA, Hideo. Über den Einfluss der Choleretika auf die Gewebsatmung der Leber .....	327
HOTTA, Ryoyu. Über die Spezifität der Phosphatase .....	343

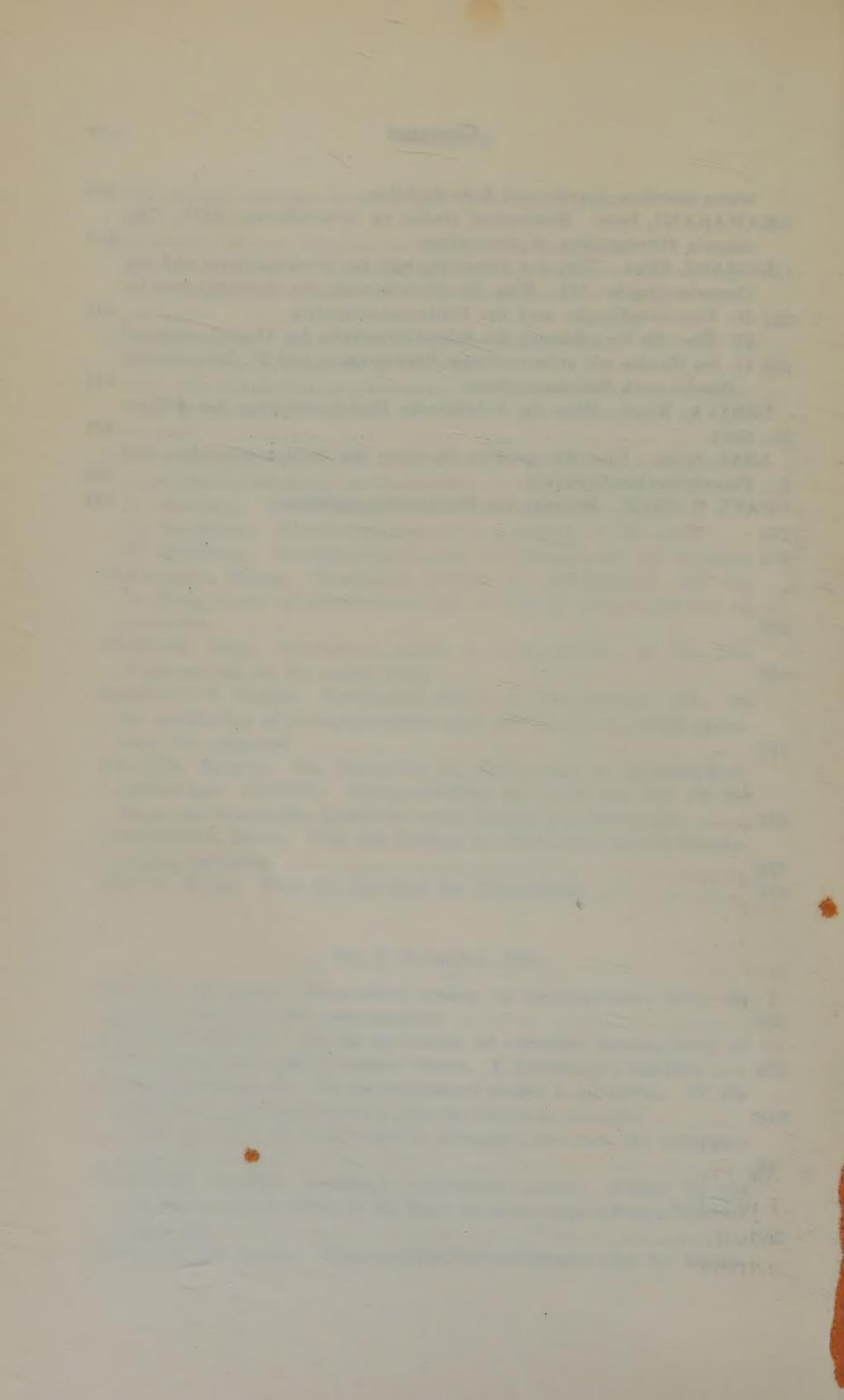
No. 3, November, 1934.

OSHIMA, Gempachi. Biochemical studies on carbohydrates. XII. On $\beta$ -glucuronosidase, 2nd communication .....	361
ARIYAMA, Noboru. On the mechanism of anaerobic decomposition of hexosephosphoric acids by animal tissues. I. Introductory remarks ....	371
MIYAHARA, Tadashi. On the biochemical studies in allantoin. IV. On the effect of adrenalin injection upon the allantoin excretion .....	383
V. On the effect of yeast nucleate administration upon the exogenous allantoin excretion .....	387
SHIMADA, Jitsuichi. Studies in experimental scurvy. XXIII. On the amounts of acetone bodies in the blood of guinea pigs fed on a Vitamin C free diet .....	395
KOBAYASHI, Tatsuo. Experimentelle Untersuchungen über die Bezieh-	

## Contents

v

ungen zwischen Avertin und Leberfunktion .....	405
KAWAKAMI, Iwao. Biochemical studies on carbohydrates. XIII. The enzymic disintegration of glucosamine .....	423
KUMAMI, Shiro. Über den Schwefelgehalt des Pankreasblutes und der Thoracicullymphe. III. Über die Beeinflussung des Schwefelhaushalts der Thoracicullymphe nach der Pankreasexstirpation .....	431
IV. Über die Beeinflussung des Schwefelhaushalts der Thoracicullymphe 1). des Hundes mit unterbundenem Pankreasgang und 2). des normalen Hundes nach Sekretininjektion .....	441
BENIYA, Kenzi. Über die katalytische Decarboxylierung der $\beta$ -Ketosäure .....	451
ARAI, Jyuro. Über die spontane Spaltung des Salolphosphorsäure und Phenylphosphosalizylsäure .....	465
PAUL T. SHEN. Beiträge zur Strychninhyperglykämie .....	481



## DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN EIWEISSSTOFFWECHSEL.

### III. Hexonbasen der Krötenleber während der Winterzeit.

VON

HIROSHI MAKINO.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

Schon früher hat Sibuya (1931) die Aminosäuren und Purinbasen des Leberextraktes von Sommerkröten quantitativ untersucht, dann habe ich (1933) über beide in der Winterzeit berichtet, um den Einfluss der Aussentemperatur auf den Eiweissumsatz klarzustellen.

Dabei kam ich zu dem Ergebnis, dass in der Leber das Tyrosin im Sommer in grösserer Menge enthalten ist als im Winter, während der Gehalt an Leucin, Alanin und Valin gerade ein umgekehrtes Verhältnis zeigt.

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der quantitativen Untersuchung der Hexonbasen der Krötenleber in der Winterzeit beschäftigt. Aus der Hexonbasenfraktion wurden keine nachweisbaren Mengen von Lysin, Arginin und Histidin gewonnen, aber aus der Lysinfraktion wurden Cadaverin und Cholin in folgendem Verhältnis gefunden:

Cadaverin	0,2434 g	0,0439 %
Cholin	0,5183 g	0,0934 %

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Wie in der vorigen Mitteilung angegeben worden ist, wurde die Phosphorwolframsäurefällung aus dem Extrakte von 5,55 kg Krötenleber im Winter in Purinbasen- und Hexonbasenfraktion geteilt, die letztere wieder in Histidin-Arginin- und Lysinfraktion getrennt.

*Histidin-Argininfraktion.* Aus der durch Silbernitrat und Baryt gefällten geringen Silberverbindung wurde in üblicher Weise unter Befreiung von Silber ein trockner Rückstand erhalten, aus dessen alkoholischer Lösung kein Kreatinin gewonnen wurde.

Aus der wässrigen Lösung des in Alkohol unlöslichen Rückstandes wurden durch Sublimat und Kohlensäure Histidin- und Argininfraktion erhalten. Aus beiden Fraktionen wurde weder Histidinpikrolonat noch Argininpikrat erhalten.

*Lysinfaktion.* Der durch Sublimat und Baryt nicht fällbare Teil wurde wieder mit Phosphorwolframsäure in bekannter Weise gefällt. Die mit Baryt zersetzte, dann von Baryt befreite Lösung wurde unter Ansäuern mit Salzsäure im Vakuum zu Sirup eingengt und mit Alkohol extrahiert. Der Alkoholauszug wurde mit einer alkoholischen Sublimatlösung versetzt und in Kälte 24 Stunden lang stehen gelassen, die Fällung wurde abgesaugt und mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung ausgewaschen.

Der Filterrückstand wurde in Wasser mit Schwefelwasserstoff zersetzt und filtriert, das Filtrat wurde im Vakuum trocken abgedampft und mit absolutem Alkohol erschöpft.

Die alkoholische Lösung wurde mit alkoholischer Platinchloridlösung versetzt, die Fällung wurde abgesaugt und mit absolutem Alkohol gewaschen. Der Rückstand wurde in heissem Wasser gelöst und in zwei Teile fraktioniert.

Das in Wasser schwer lösliche, in Form von rötlichgelben Prismen, zuweilen von Nadeln, kristallisierende Chloroplatinat wurde mehrmals aus heissem Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 1,2210 g. Es beginnt gegen 216°C dunkel bräunlich zu werden und zersetzt sich unter Aufschäumen bei 231–232°C.

*Analyse:* 0,1397 g Subst. gaben 0,0524 g Pt.

0,0715 „ „ „ 0,0278 „ „

0,1108 „ „ „ 0,0424 „ „

$C_5H_{14}N_2H_2PtCl_6$ . Ber. 38,12% Pt.

Gef. 37,50, 38,88, 38,26% Pt.

Die durch Schwefelwasserstoff von Platin befreite Base wurde mit einer alkoholischen Natriumpikratlösung versetzt, die Fällung wurde abgesaugt und aus heissem Wasser umkristallisiert. Der

erhaltene Nadelkristall ist in Wasser schwer löslich und zersetzt sich bei 220–221°C.

### N-Bestimmung nach Weizmann, Yofe u. Kirzon.

0,0300 g Subst. verbrauchten 4,20 ccm N/10 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

0.0450  $\mu$       n      n      6.35  $\mu$       n      n

C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>·2C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH. Ber. 20.00% N.

Gef 19.60 19.75% N

Nach diesen Resultaten stimmt die Substanz mit Cadaverin überein.

Das in Wasser leicht lösliche Platindoppelsalz betrug 1,3185 g. Es hat sich als orangefarbene sechsseitige Tafeln oder als lange Nadeln ausgeschieden und bei 232–234°C zersetzt.

Analyse: 0.1213 g Subst. gaben 0.0381 g Pt.

$(C_5H_{14}NOCl)_2PtCl_4$ . Ber. 31.67% Pt.

Gef. 31.40 ..

Durch die charakteristischen Kristallformen und die Analyse erwies es sich als Cholin.

Aus dem Filtrat der Sublimatfällung wurde unter den üblichen Bedingungen kein Lysinmikrat erhalten.

LITERATUR

Makino, H. (1933): Jl. of Biochem., 18, 387.

Sibuya, S. (1931): Jl. of Biochem., **14**, 111.

Weizmann, M., Yofe, J. u. Kirzon, B. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chem. 192, 70.



## ÜBER DEN CALCIUM- UND PHOSPHORSTOFF- WECHSEL II.

### Einfluss des Carotins und Gallosterins auf den Kalk- sowie Phosphorgehalt des Blutes.

VON

INAO ISHIDA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut, Okayama. Direktor:  
Prof. T. Shimizu u. dem Zentralhospital Kurashiki.)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

In der ersten Mitteilung (1933) habe ich berichtet, dass die Bilanz des Kalkes sowie des Phosphors bei Kaninchen durch Zufuhr von  $\beta$ -Carotin od. Gallosterin gesteigert und die negative Bilanz sogar positiv wird, wodurch die Ausscheidung des Kalkes und Phosphors sowohl im Harn als auch im Kot vermindert wird, obwohl die Gallensäure, ein Bestandteil des Gallosterins, nach Sekito (1929) die Phosphor- u. Kalkausscheidung im Harn vermehrt und nach Fuziwara (1931) u. Okii (1932) die im Kote vermindert. Weiter wurde dabei berichtet, dass die Kalkbilanz bei Gallosterin und die Phosphorbilanz bei  $\beta$ -Carotin ziemlich viele Tage lang gesteigert bleibt, und dass die die Kalkbilanz steigernde Wirkung bei Zufuhr von Gallosterin viel stärker auftritt als bei Zufuhr von Gallensäure.

Es ist allgemein bekannt, dass Vitamin D und Parathhormon mit dem Calcium- und Phosphorstoffwechsel in innigem Zusammenhang stehen, da beide den Kalk- sowie den Phosphorgehalt im Blute steigern. Seit Embden (1924) Greenwald (1925) u. Jost (1927) ist sicher, dass der Organismus seinen Phosphorbedarf aus organischen Phosphorbindungen voll decken kann. Daher ist es interessant, den Einfluss des Gallosterins u.  $\beta$ -Carotins auf den Phosphorgehalt des Blutes, besonders auf den organischen Phosphorgehalt, zu erforschen.

Nach den Untersuchungen von Kimura (1931) u. Sekito

(1930) soll die Gallensäure, ein Bestandteil des Gallosterins, den Kalk- sowie den organischen u. anorganischen Phosphorgehalt des Blutes bei Tieren steigern.

Somit muss wenigstens ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Kalk u. Phosphor im Blut u. dem im Harn bei Zufuhr von  $\beta$ -Carotin oder Gallosterin, bes. bei Zufuhr von letzterem, bestehen, obwohl Walker (1932) keine Korrelation zwischen dem organischen Phosphorgehalt im Blute und der Ausscheidung von anorganischem sowie organischem Phosphor im Harn beobachtet hat.

Was den Kalk- sowie den anorganischen u. organischen Phosphorgehalt des Blutes bei Zufuhr von Vitamin A oder Provitamin A (Carotin) anbetrifft, so wurde, soweit ich die Literatur kenne, noch nichts darüber berichtet.

In obigem Sinne habe ich nun den Einfluss des  $\beta$ -Carotins u. Gallosterins auf den Kalk- sowie Phosphorgehalt im Blut untersucht, um den Kalk- sowie Phosphorstoffwechsel unter dem Einfluss von Vitamin A klarzustellen.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden junge Ziegen und erwachsene Kaninchen verwendet, die mit einer bestimmten Menge von Gerste, Gemüse u. Wasser mindestens eine Woche lang gefüttert worden waren. Den Ziegen wurde dabei die Gerste (20 g), das Gemüse (20 g) und das Wasser (20 ecm) pro Kilo, in 2 Teile geteilt, um 9 Uhr morgens und um 4 Uhr nachmittags verabreicht.

Die Kaninchen wurden mit 50 g Gerste, 50 g Gemüse u. 50 ecm Wasser, in 2 Teile geteilt, morgens u. abends genau wie die Ziegen gefüttert.

Nachdem der Kalk- und Phosphorgehalt des Blutes, entnommen aus den Ohr- od. Halsvenen, einmal bestimmt worden war, wurden den Tieren 2–5 ecm einer 0,1% igen Carotinlösung in Olivenöl oder 2–3 ecm einer 2% igen Gallosterinlösung (mit N/10 NaOH neutralisiert) pro Tier subcutan injiziert; vor u. nach der Injektion wurde der Kalk- und Phosphorgehalt des Blutes stündlich bestimmt. Als Kontrolle wurde zuerst der Einfluss der bestimmten

Nahrung: 50 g Gerste, 50 g Getreide u. 50 ccm Wasser, und der wiederholten Blutentnahme auf den Kalkgehalt des Blutserums der Kaninchen untersucht, dann verabreichte man den Tieren 2 ccm Olivenöl subcutan, und bestimmte den Kalk- sowie Phosphorgehalt des Blutes, genau wie bei dem eigentlichen Versuch, um den Einfluss des Olivenöls festzustellen. Andrerseits wurde als Kontrolle auch der Einfluss der Gallensäure auf den Phosphorgehalt des Blutes untersucht.

Während der stündlichen Blutentnahme wurden die Tiere immer nüchtern gehalten. Bei den Ziegen wurden jedesmal 10 ccm Blut entnommen und sein Phosphorgehalt bestimmt. Bei den Kaninchen wurden jedesmal 6–7 ccm Blut entnommen und dessen Kalkgehalt festzustellen.

Der Kalkgehalt des Blutserums wurde nach der von Inouye (1922) modifizierten Methode von De Waard, und der anorganische sowie der gesamte säurelösliche Phosphorsäuregehalt im Blut nach der Methode von Embden (1921) gravimetrisch bestimmt; die Differenz zwischen beiden wurde als organische säurelösliche Phosphorsäure berechnet.

### I. VERSUCH BEI KANINCHEN.

#### 1. Einfluss der Nahrung und der Blutentnahme auf den Kalkgehalt des Blutserums.

Bei dem ersten Kontrollversuche wurde den Kaninchen um 9 Uhr morgens eine Hälfte der obenerwähnten bestimmten Nahrung verabreicht, den Tieren vor u. nach der Nahrungszufuhr das Blut ständig entnommen und sein Kalkgehalt bestimmt.

Erst um 4 Uhr abends wurde die zweite Hälfte der Nahrung verabreicht, und 24 Stunden nach der ersten Blutentnahme noch einmal der Kalkgehalt des Blutes bestimmt, um den Einfluss der Nahrung auf den Kalkgehalt festzustellen. Um den Einfluss der wiederholten Blutentnahme auf den Kalkgehalt des Blutserums zu beobachten, wurde dann dieselbe Behandlung ohne Fütterung ausgeführt.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass der Blutkalkgehalt 2

TABELLE I.  
(Nahrungsauaufnahme)  
Serumealcium (mg%)

Nr.	Dat.	K.G.	Vor	Nach Stunden							
				1	2	3	4	5	6	7	24
1.	16/III.	2310	11,5	11,9	11,3		9,3	9,0			11,6
2.	"	2140	13,5	14,0		13,5	12,6				12,1
3.	17/ "	2320	12,8	13,6	14,5		14,0				14,4
4.	"	2585	12,0		12,2	11,5	11,2				11,9
5.	18/ "	2360	13,5	13,5	13,7	14,0		12,8			13,7
6.	20/ "	2415	14,6	14,8		14,6		13,5	11,3		12,5
7.	"	2450	11,4	12,6		12,4		11,8	11,6		
8.	22/ "	2310	14,0				14,7	13,9	14,5	13,3	14,4
9.	"	2050	13,9				14,7	13,0	13,0	11,7	13,0
10.	24/ "	2130	13,5			14,2		14,4	13,5	12,5	14,4
11.	"	2560	13,2				14,4	13,3	11,7	11,9	14,4
12.	25/ "	2710	13,5			14,4	14,2	13,1		13,0	13,2

Stunden nach der Nahrungsauaufnahme sein Maximum erreicht, dass er um 1,4–13,3% vermehrt wird und durch die fortlaufende Blutentnahme allmählich herabgesetzt wird. Sein Verminderungsgrad bei der letzten Blutentnahme beträgt höchstens um 16,6%, um nach 24 Stunden in den meisten Fällen wieder zum Anfangswert zurückzukehren, obwohl nach der letzten Blutentnahme die bestimmte Nahrung verabreicht wurde.

## 2. Einfluss des Gallosterins auf den Blutkalkgehalt.

Bei diesem Versuch wurden den Kaninchen 2 ccm einer 2%igen Gallosterinlösung pro Tier subcutan verabreicht; der Kalkgehalt des Blutserums wurde in kurzen Intervallen fortlaufend bestimmt, genau wie bei dem Kontrollversuch.

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle II angegeben.

Aus der Tabelle II lässt sich ersehen, dass der Kalkgehalt des Serums in den meisten Fällen 2 Stunden nach der Gallosterinzufuhr herabgesetzt ist, um sich nach 5 Stunden wieder zu vermehren und nach 24 Stunden zum Anfangswert zurückzukehren.

TABELLE II.  
(Gallosterin 40 mg)

Nr.	Dat.	K.G.	Vor	Nach Stunden							
				1	2	3	4	5	6	7	24
	T/M	g									
1.	25/III	2310	13,5	13,1	11,0		9,2				
2.	27/ „	2240	14,6	14,6		12,2	9,9		11,0		13,7
3.	„	2380	13,4	11,2	9,0		9,9		12,6		14,0
4.	28/ „	2450	12,8	9,3		7,5	8,7		10,2		12,8
5.	„	2360	12,7	10,0	8,7		10,0		9,7		12,0
6.	„	2130	12,0	9,4	8,4		9,4		10,3		11,6
7.	29/ „	2570	11,7	10,7		7,9	8,6		10,0		11,1
8.	30/ „	2320	14,9	10,8	10,1			10,5		13,9	14,5
9.	„	2150	13,8	9,9		9,0		10,1		11,7	
10.	31/ „	1950	12,6	10,0	8,4			9,3		9,0	12,7
11.	„	1920	12,1	9,7	7,9			7,4		9,3	11,7
12.	11/IV	1980	11,7	10,2	8,7	9,3		11,4			11,3
13.	„	2190	13,6	10,4	9,9	9,7		11,7			15,2
14.	12/ „	1920	12,8	9,4	9,0		9,4		11,5		13,5
15.	„	2100	12,6	10,6	10,8		10,1		11,2		12,8

Der Verminderungsgrad beträgt durchschnittlich 28,5%.

Durch den Versuch von Sekito (1930) ist schon bekannt geworden, dass die Gallensäure eine hypercalcämische Wirkung hat. Aus den obigen Daten scheint mir nun hervorzugehen, dass die Gallensäure gegen das Vitamin A auf den Blutkalkspiegel antagonistisch wirkt. Gallensäure und Vitamin A wirken also zusammen hypocalcämisch. Dies beruht nach meiner Meinung auf der den Kalkansatz in den Organen u. Geweben fördernden Wirkung von Vitamin A und Gallensäure.

### 3. Einfluss des $\beta$ -Carotins auf den Blutkalkgehalt.

Bei diesem Versuch verabreichte man als Kontrolle 2 ccm Olivenöllösung pro Tier subcutan und bestimmte vor u. nach der Injektion stündlich den Kalkgehalt des Blutserums, um den Einfluss des für  $\beta$ -Carotin benutzten Lösungsmittels zu beobachten.

Aus der Tabelle III A ist ersichtlich, dass der Kalkgehalt des

TABELLE III. A.  
(Olivenöl 2 cem)  
Serumcalcium (mg%)

Nr.	Dat.	K.G.	Vor	Nach Stunden							
				1	2	3	4	5	6	7	24
1.	11/IV	2060	12,7	10,1	9,7		10,7		9,8		12,1
2.	„	2130	12,1	11,3	10,0		10,3		9,3		11,8
3.	13/ „	2100	12,4		11,4	11,4		10,2			
4.	„	2250	13,0		11,6	10,4		8,8		9,6	
5.	14/ „	2050	11,7	11,4	10,7		10,3			10,0	10,3

TABELLE III. B.  
( $\beta$ -Carotinlösung 2 cem)

1.	8/IV	2210	13,3	11,7	9,6	11,0			10,9		14,4
2.	„	2150	11,3	8,0	6,9	6,3			9,0		11,6
3.	10/ „	2000	12,3	9,9	10,8	9,9		9,2			13,5
4.	„	2220	13,6	10,3	9,9	10,4		9,9			13,1

Blutserums bei Zufuhr von Olivenöl sich genau so verhält wie bei der Blutentnahme. Der durchschnittliche höchste Verminderungsgrad beträgt 21,3%.

Das Olivenöl übt also auf den Kalkgehalt des Blutserums fast keinen Einfluss aus. Bei dem eigentlichen Versuch wurden den Kaninchen um 9 Uhr morgens 2 cem einer 0,1%igen  $\beta$ -Carotinlösung in Olivenöl pro Tier subcutan gegeben; dann wurde ihr Einfluss auf den Kalkgehalt des Blutserums vor und nach der Zufuhr ständig untersucht.

Aus den Tabellen III B u. IV erhellte, dass der Kalkgehalt des Blutserums im allgemeinen durch Zufuhr von  $\beta$ -Carotin herabgesetzt wird, dass diese Herabsetzung 3-4 Stunden nach der  $\beta$ -Carotinzufuhr am stärksten auftritt, und dass sie dann noch weitere 24 Stunden lang andauert. Der durchschnittliche höchste Verminderungsgrad beträgt 29,4-33,6%.

Das  $\beta$ -Carotin wirkt also hypocalämisch. Aus den obigen Ergebnissen kann wohl der Schluss gezogen werden, dass der

TABELLE IV.

(Serumealcium (mg%))

Nr.	Dat.	K.G	Vor	Nach Stunden							
				1	2	3	4	5	6	7	24
1.	1/IV	2450	12,2	11,8	10,0	7,1			8,8		
2.	"	2350	14,1	12,0	10,3	7,8				9,3	
3.	4/ "	1870	11,7	10,2	8,4		8,7		8,0		9,3
4.	"	1930	12,1	10,1	8,6		7,1		9,4		10,0
5.	5/ "	1980	12,1		9,7	8,3		8,0		8,8	10,1
6.	"	1990	12,2		9,8	8,3		8,4		10,0	12,0
7.	6/ "	2150	11,3		9,9	9,9		8,7		9,4	11,7
8.	"	2060	11,6		10,7	9,4	7,5		10,8		9,7
9.	7/ "	2310	12,3	10,9		9,7	9,3			8,8	12,1
10.	"	1870	13,0	9,3		8,0	8,0		9,8		12,1

Serumkalkgehalt durch  $\beta$ -Carotin eine stärkere und länger dauernde Herabsetzung erfährt als durch Gallosterin.

## II. VERSUCH BEI ZIEGEN.

### 1. Einfluss der Gallensäure auf den Phosphorgehalt des Blutes.

Als Kontrolle wurden den Ziegen zuerst 3 ccm einer 2%igen Natriumcholatlösung pro Tier subcutan injiziert; vor u. nach der Zufuhr wurde stündlich der gesamte sowie der säurelösliche organische Phosphorgehalt des Blutes bestimmt, um den Einfluss der Gallensäure auf diesen Phosphorgehalt des Blutes festzustellen.

Aus der Tabelle V lässt sich ersehen, dass der anorganische sowie der organische Phosphorgehalt des Blutes durch die Zufuhr der Cholatlösung vermehrt wird, und dass diese Vermehrung 2–3 Stunden nach der Zufuhr der Cholatlösung am stärksten auftritt, um nach 5 Stunden im allgemeinen wieder zum Anfangswert oder bis zu subnormal abzusteigen, wie es schon Kimura (1931) bei seinem Versuch beobachtet hat. Der durchschnittliche höchste

TABELLE V.

Nr.	Stunden	P (Mg%) Gallensäure 60 mg		P (Mg%) Gallosterin 60 mg		P (Mg%) Gallosterin 60 mg	
		anorg.	org.	anorg.	org.	anorg.	org.
1	Vor	5,61	6,11	4,08	10,70	5,61	12,23
	nach 1	6,12	6,11	4,33	11,98	5,61	12,74
	2	6,37	6,37	5,35	13,51	6,37	12,49
	3	6,88	6,88	5,10	13,76	5,86	10,45
	4	6,37	6,37	4,59	11,21	5,35	9,43
2	Vor	5,10	8,66	5,10	6,62	4,59	6,62
	nach 1	5,35	8,92	6,37	6,37	4,84	9,94
	2	5,61	9,17	7,90	7,90	5,86	13,00
	3	5,86	9,43	6,62	7,14	6,12	6,11
	4	5,35	8,92	5,61	4,58	5,35	4,33
3	Vor	4,08	4,60	7,13	5,61	4,84	8,92
	nach 1	4,08	7,64	8,66	7,14	5,35	10,45
	2	4,59	8,66	8,92	11,97	6,37	9,94
	3	5,86	7,90	5,86	10,45	5,10	10,70
	4	4,33	6,37	6,37	8,92	5,10	8,15
4	Vor	5,86	7,90	4,08	8,15		
	nach 1	5,86	8,41	5,35	9,94		
	2	5,86	8,92	7,64	11,72		
	3	6,12	9,17	5,10	11,72		
	4	6,37	7,90	5,35	9,43		
5	Vor	7,90	7,39	5,10	11,21		
	nach 1	7,64	8,16	5,35	13,00		
	2	7,64	8,16	5,86	14,01		
	3	8,15	4,08	5,61	9,17		
	4	5,10	9,68	5,35	7,90		
6	Vor			5,61	11,21		
	nach 1			6,12	13,00		
	2			6,62	14,01		
	3			6,37	9,17		
	4			6,12	7,90		
	5			5,61	4,84		

Vermehrungsgrad beträgt beim anorganischen Phosphorgehalt 12,1% und beim organischen 37,7%.

## 2. Einfluss des Gallosterins auf den Phosphorgehalt des Blutes.

Diesmal injizierte man den Ziegen 3 ccm einer 2%igen Gallosterinlösung pro Tier subeutan und bestimmte, vor u. nach der Zufuhr stündlich den gesamten sowie den säurelöslichen organischen Phosphorgehalt, um den Einfluss der Gallensäure und des Vitamin A zusammen auf den Phosphorgehalt des Blutes zu beobachten.

Aus der Tabelle V ist ersichtlich, dass der anorganische sowie der organische Phosphorgehalt des Blutes durch die Zufuhr des Gallosterins vermehrt wird, und dass diese Vermehrung 2–3 Stunden nach der Gallosterinzufuhr am stärksten auftritt.

Dieser durch Gallosterin vermehrte organische Phosphor wird aber 4–5 Stunden nach der Gallosterinzufuhr subnormal herabgesetzt, während beim anorganischen Phosphor in derselben Zeit fast der Anfangswert wiederhergestellt wird.

Der durchschnittliche höchste Vermehrungsgrad beträgt beim anorganischen Phosphor 36,1% und beim organischen 52,3%. Die Vermehrung des anorganischen sowie des organischen Phosphorgehaltes des Blutes, besonders die des letzteren, tritt bei Zufuhr von Gallosterin viel stärker und früher auf als bei Zufuhr von Gallensäure allein. Das Vitamin A verstärkt also die den Phosphor im Blut vermehrende Wirkung der Gallensäure. Diese Vermehrung des Phosphors, bes. die des organischen, im Blut beruht höchstwahrscheinlich auf der den Nucleinstoffwechsel fördernden Wirkung der Gallensäure und auf der die Glykogenbildung fördernden Wirkung von Gallensäure u. Vitamin A. Die den Nucleinstoffwechsel sowie die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Gallensäure wurde schon von vielen Autoren wie Karasawa (1926), Okamura (1928), Fuzita (1930) u. Fuziwara (1932) bestätigt.

## 3. Einfluss des $\beta$ -Carotins auf den Phosphorgehalt des Blutes.

Als Kontrolle wurden den Ziegen 2 ccm Olivenöl subeutan in-

jiziert. Zum eigentlichen Versuch wurden den Tieren 2 ccm einer 0,1%igen olivenölichen  $\beta$ -Carotinlösung subcutan verabreicht; vor u. nach der Zufuhr wurden der anorganische sowie der organische Phosphorgehalt des Blutes stündlich bestimmt. Weiter wurde dieser am nächsten Tage nach 24 Stunden nochmals bestimmt.

TABELLE VI.

Nr.	Stunden	P (Mg%) Olivenöl 2 ccm		P (Mg%) Carotin 60 mg		P (Mg%) Carotin 60 mg	
		anorg.	org.	anorg.	org.	anorg.	org.
1	Vor	6,12	6,62	5,86	6,88	4,07	14,30
	nach 1	5,35	7,39	6,12	7,13	4,58	14,78
	2	5,35	6,88	6,38	6,36	5,35	15,03
	3	5,10	6,11	7,13	7,65	4,07	16,33
	4	5,10	6,11	6,38	6,87		
	5	5,86	6,88	3,57	8,15		
2	24					4,33	18,09
	Vor	6,88	6,88	4,84	4,58	4,07	16,74
	nach 1	6,37		5,10	5,60	5,10	15,28
	2	5,86		5,10	3,31	4,58	17,33
	3	5,86	6,88	5,86	5,86	3,82	19,11
	4	5,86	6,88	5,35	6,11		
3	5	5,86	6,88	4,59			
	24					4,33	17,07
	Vor	7,13	7,14	4,59	5,60	4,12	13,71
	nach 1	7,13	7,14	5,35	4,84	4,58	16,31
	2	6,88	6,88	5,61	5,09	5,18	14,18
	3	6,88	6,88	5,59	4,58	4,58	13,76
4	4	6,62	7,14	3,82	5,86		
	5	6,62	7,65	4,08	4,07		
	24			4,08	4,60	5,35	11,98
	Vor	6,12	4,07	7,39	3,31	3,06	11,21
	nach 1	6,12	4,07	7,90	2,80	2,55	10,19
	2	5,86	4,33	8,41	2,80	3,31	9,94
5	3	6,12	3,56	8,90	2,82	3,82	12,49
	4	6,12	3,56	7,13	2,55	3,82	14,07
	5	6,37	2,80	6,62	4,08		
	24					4,56	12,24
	Vor	3,57	6,11	6,12	6,62		
	nach 1	3,92	5,86	6,37	6,37		
	2	3,57	5,60	6,62	7,14		
	3	3,57	6,11	6,62	7,65		
	4	3,57	5,60	5,86	5,35		
	5	3,57	6,11	5,86	6,37		

Aus der Tabelle VI lässt sich ersehen, dass der anorganische sowie der organische Phosphorgehalt des Blutes durch die Zufuhr des Olivenöls die Neigung bekommt, sich zu vermindern, obwohl diese Verminderung ganz gering ist. Dies ist höchstwahrscheinlich durch die Blutentnahme bedingt.

Durch Zufuhr von  $\beta$ -Carotin wird der anorganische sowie der organische Phosphorgehalt des Blutes, wie aus der Tabelle VI erhellt, im allgemeinen vermehrt. Diese Vermehrung tritt beim anorganischen Phosphorgehalt in vielen Fällen 2–3 Stunden nach der  $\beta$ -Carotinzufuhr am stärksten auf, während die des organischen später, erst 3–4 Stunden nach der  $\beta$ -Carotinzufuhr ihr Maximum erreicht. Beide steigen dann allmählich ab, um nach 24 Stunden wieder bis zu übernormal aufzusteigen. Der höchste durchschnittliche Vermehrungsgrad des anorganischen Phosphorgehaltes beträgt durchschnittlich 12,1–25,5% und der des organischen 31,2–37,7%. Das  $\beta$ -Carotin führt also eine Hyperphosphataemie herbei.

Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass bei Zufuhr von Gallosterin sowie von  $\beta$ -Carotin der Serumkalkgehalt mit der Ausscheidung im Harn u. Kot parallel geht, nicht jedoch der Phosphorgehalt.

Diese Daten über den Phosphorgehalt des Blutes und über die Phosphorausscheidung im Harn stimmen mit denen von Walker (1932) überein, da der Phosphorgehalt des Blutes durch Zufuhr von Gallosterin oder  $\beta$ -Carotin vermehrt, die Phosphorausscheidung im Harn u. Kot dagegen durch diese herabgesetzt wird.

$\beta$ -Carotin (Provitamin A) sowie Vitamin A müssen also den Kalk aus der Nahrung in irgendwelchen Organen und Geweben deponieren. Auch muss der Phosphor aus der Nahrung mit dem Kalk in Organen und Geweben bei Zufuhr von  $\beta$ -Carotin (Provitamin A) oder Vitamin A gespeichert werden, obwohl der Phosphorgehalt des Blutes durch diese vermehrt wird, wie es auch bei der Zufuhr von Vitamin D der Fall ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der Kalkgehalt des Blutserums wird durch Nahrungsaufnahme gesteigert, und diese Steigerung wird durch wiederholte

Blutentnahme allmählich herabgesetzt.

2. Durch Zufuhr von Gallosterin sowie von  $\beta$ -Carotin wird der Kalkgehalt des Blutserums bei Kaninchen herabgesetzt, um entweder wieder zum Anfangswert zurückzukehren oder noch weiter herabgesetzt zu bleiben.

3. Der organische sowie der anorganische Phosphorgehalt des Blutes wird durch Zufuhr von Gallosterin und  $\beta$ -Carotin gesteigert, um allmählich wieder zum Anfangswert oder sogar bis zu subnormal abzusteigen. Aus diesen Daten geht hervor, dass das Vitamin A auf den Kalk- sowie den Phosphorstoffwechsel anders wirkt als das Vitamin D, da das Vitamin A den Kalkgehalt des Blutes vermindert, den Phosphorgehalt aber vermehrt.

Zum Schluss möchte ich nicht verfehlten, Herrn Dr. S. Wada, Direktor der Pädiatrischen Klinik des Zentralhospitals Kurashiki, für die Förderung bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

- Emden, G. (1921): Zs. Physiolog. Chem., **113**, 138.
- Fuzita, S. (1930): J. of Bioch., **12**, 383.
- Fuziwara, K. (1931): J. Bioch., **13**, 43 u. 465.
- Fuziwara, K. (1932): Bioch. Zschr., **248**, 264.
- Greenwald, I. (1925): J. of biolog. Chem., **63**, 339.
- Inouye, T. (1922): Tokyo Igakkai Zasshi, **36**, 461.
- Ishida, I. (1933): J. Bioch., **18**, 479.
- Jost, H. (1927): Zs. Physiolog. Chem., **165**, 171.
- Karasawa, R. (1926): J. Bioch., **6**, 139.
- Kimura, T. (1931): J. Bioch., **14**, 51.
- Okamura, T. (1928): J. Bioch., **8**, 391.
- Okii, I. (1932): J. Bioch., **16**, 217.
- Sekito, T. (1930): J. Bioch., **12**, 59.
- Sekito, T. (1929/30): J. Bioch., **11**, 251 u. 391.
- Walker, B. S. (1932): J. of Labor. u. Clin. Med., **17**, 347.

## ÜBER DEN CALCIUM- UND PHOSPHORSTOFF- WECHSEL III.

### Einfluss des Carotins auf den Kalkgehalt in Organen und Geweben.

VON

INAO ISHIDA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama und dem  
Zentralhospital Kurashiki.)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

In der ersten Mitteilung habe ich (1933) berichtet, dass die positive Bilanz des Kalkes bei Kaninchen durch Zufuhr von Carotin gesteigert und die negative Bilanz dadurch sogar positiv wird, und weiter, dass diese gesteigerte u. positiv gewordene Bilanz nach dem Aufhören der Carotinzufuhr wieder negativ wird, wenn die durch Carotin herabgesetzte Kalkausscheidung im Harn u. Kot nach dem Aufhören der Carotinzufuhr wieder übernormal gesteigert wird.

Auch der Kalkgehalt des Blutserums wird, wie in der zweiten Mitteilung (1934) angegeben wurde, durch Zufuhr von Carotin herabgesetzt. Der Kalk muss also durch Zufuhr von Carotin in irgendeinem Organ und Gewebe deponiert werden, wodurch die Verteilung des Kalkes in der Organen und Geweben verändert wird.

In diesem Sinne habe ich unter Zufuhr von Carotin den Kalkgehalt der verschiedenen Organe und Gewebe: Leber, Niere, Lunge, Herz, Muskel u. Knochen, untersucht. Was den normalen Kalkgehalt der verschiedenen Organe und Gewebe bei Kaninchen betrifft, so wurde von Bryant u. Talbot (1931) nur hinsichtlich des Muskels angegeben, dass der Kalkgehalt im frischen Muskel 7,2–18,3 mg% beträgt.

Nach Goto (1922) soll der Kalkgehalt der Leber bei einem einen Tag fastenden Kaninchen durchschnittlich 1,8 mg%, der des Muskels 2,4 mg% und der des Gehirns 5,7 mg% betragen.

### EXPERIMENTELLER TEIL.

Nach den Untersuchungen von Heubner (1931) soll der Calciumgehalt der festen Gewebe und somit auch derjenige der Organe eine besonders grosse Schwankungsbreite aufweisen. Daher war es zweckmässig, den Kalkgehalt der Organe und Gewebe von vielen jungen und erwachsenen Kaninchen zu untersuchen, um seinen Durchschnittswert zu erhalten.

Infolgedessen wurden sowohl junge als auch erwachsene Kaninchen jeden Tag mit einer bestimmten Nahrung, die in zwei Teile geteilt wurde, morgens u. abends gefüttert. Die Nahrung bestand aus 50 g Gerste, 50 g Gemüse u. 50 g Wasser. Den mit dieser Nahrung eine Woche lang gefütterten Kaninchen wurde morgens in der nüchternen Zeit 1 ccm einer 0,3%igen Carotinlösung in Olivenöl subcutan injiziert. Der Kalkgehalt des Serums wurde, wie in der zweiten Mitteilung berichtet wurde, 4 Stunden nach der Carotinzufuhr am stärksten herabgesetzt. Daher wurden die Kaninchen 4 Stunden nach der Carotinzufuhr unter Verblutung getötet und ihre Organe u. Gewebe herausgeholt.

Zum Versuch wurde Knochen aus dem Femur, Muskel aus dem oberen Oberschenkelmuskel herausgeschnitten. Von den Organen wurden ein Teil der Leber, beide Lungen u. Nieren und das ganze aus dem Herzbeutel herausgeholt blutfreie Herz zum Versuch verwendet.

Abgewogene Mengen der vom Blut befreiten Organe bzw. Gewebe wurden einzeln im Mörser gut zu Brei zerrieben und unter Austrocknung im Trockenschrank mit Sodaspalpeter verascht. Der Kalkgehalt von salzsäuresauren Aschenauszügen der einzelnen Organe und Gewebe wurde nach der von Clark u. Collip (1925) modifizierten Methode von Kramer u. Tisdall bestimmt.

Als Kontrolle wurde der Kalkgehalt der einzelnen Gewebe und Organe von normalen Kaninchen in der gleichen Weise bestimmt. Das Carotin wurde nach Kuhn u. Lederer (1931) aus Carotten dargestellt, zum Versuch wurde rohes Carotin verwendet. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I u. II zusammengestellt.

*1. Kalkgehalt der Organe u. Gewebe von  
normalen Kaninchen.*

Beim Versuch wurden sowohl die jungen als auch die erwachsenen Kaninchen 17 Stunden nach der letzten Fütterung getötet; dann wurde der Kalkgehalt der verschiedenen Organe und Gewebe untersucht.

TABELLE I.  
(Normal Ca mg%)

Nr.	K.G.	Muskel.	Knochen.	Leber.	Niere.	Lunge.	Herz.
1.	2230	20,72	9513,05	21,12	8,52	10,35	13,01
2.	2120	23,11	7897,63	16,08	20,13	13,20	6,49
6.	2130	23,33	7982,82	14,85	16,56	15,26	10,45
7.	2230	21,67	10284,42	21,95	13,67	17,54	16,19
9.	2150	19,46	6328,44	14,27	13,04	19,28	7,65
10.	2680	17,56	8363,04	10,66	13,84	15,47	17,12
11.	2380	17,87	8840,29	19,70	19,88	18,84	17,88
12.	2420	20,87	9309,30	17,13	15,34	17,84	15,41
13.	2130	15,71	8816,95	19,67	18,45	18,45	13,28
14.	2300	24,86	8893,65	17,48	16,05	17,73	11,07
Durchschnittswert.		20,52	8622,96	17,29	15,55	16,40	12,86
3.	1980	21,57	7737,21	16,09	13,33	15,76	9,41
4.	1975	14,55	8378,42	19,43	19,88	15,99	10,21
5.	2095	20,54	7732,80	18,33	13,40	15,78	15,33
8.	1950	16,72	8541,45	16,17	14,41	13,83	7,54
15.	1947	20,11	9225,35	17,69	16,59	18,48	14,77
Durchschnittswert.		18,70	8323,07	17,54	15,52	15,97	11,45

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass der durchschnittliche Kalkgehalt des Muskels 19,91 mg%, der des Knochens 8522,99 mg%, der der Leber 17,37 mg%, der der Niere 15,54 mg%, der der Lunge 16,24 mg% und der des Herzens 12,39 mg% beträgt. Der Kalkgehalt des Muskels stimmt gut mit der Angabe von Bryant u. Talbot (1931) überein. Der Kalkgehalt der Gewebe ist im

allgemeinen bei jungen Kaninchen kleiner als bei erwachsenen, während in Bezug auf den Kalkgehalt der Organe kein Unterschied zwischen jungen und erwachsenen Kaninchen zu finden ist.

*2. Kalkgehalt der Organe u. Gewebe von Kaninchen bei Zufuhr von Carotin.*

Auch diesmal wurden die Kaninchen 17 Stunden nach der letzten Fütterung, 4 Stunden nach der Carotinzufuhr, getötet; dann wurde der Kalkgehalt der Organe u. Gewebe untersucht.

TABELLE II.  
(Carotinzufuhr Ca mg%)

Nr.	K.G.	Muskel.	Knochen.	Leber.	Niere.	Lunge.	Herz.
1.	2365	24,28	10896,88	25,28	14,08	9,04	10,35
2.	2140	26,06	10773,38	18,67	20,69	10,52	11,51
3.	2220	24,67	10270,57	15,83	15,71	11,12	11,72
4.	2650	30,19	9969,89	18,03	15,83	9,75	11,89
5.	2700	25,75	11802,70	17,89	19,54	10,60	11,52
6.	2220	27,18	8683,99	18,43	16,70	10,38	11,11
7.	2130	21,88	10364,95	18,33	15,22	12,09	9,06
8.	2310	23,91	9422,21	18,19	21,33	10,23	13,35
14.	2350	24,14	8555,52	20,17	16,82	12,10	13,01
15.	2260	24,77	9489,04	20,07	9,32	11,61	12,01
Durchschnittswert.		25,28	10022,91	19,09	16,52	10,74	11,55
9.	1770	25,85	9209,15	19,83	11,83	10,06	10,76
10.	1740	24,86	8734,71	19,06	15,26	10,68	12,00
11.	1865	24,74	9449,74	22,72	20,55	9,95	11,68
12.	1995	25,51	9245,55	18,39	13,72	10,05	11,79
13.	2065	25,12	9223,51	18,34	18,55	12,50	12,55
Durchschnittswert.		25,22	9172,53	19,67	15,98	10,65	11,76

Aus der Tabelle II lässt sich ersehen, dass der durchschnittliche Kalkgehalt des Muskels bei Zufuhr von Carotin 25,26 mg%, der des Knochens 9739,45 mg%, der der Leber 19,28 mg%, der der

Niere 16,34 mg%, der der Lunge 10,71 mg% und der des Herzens 11,62 mg% beträgt.

Durch die Zufuhr von Carotin wird der Kalkgehalt im Muskel um 26,87%, im Knochen um 14,27%, in der Leber um 10,99% und in der Niere um nur 5,15% vermehrt, während gerade umgekehrt der Kalkgehalt in der Lunge um 34,05% und im Herzen um 6,21% vermindert wird.

Der Kalk wird also durch die Wirkung des Carotins am stärksten im Muskel deponiert, dann folgen der Reihe nach die Knochen, die Leber u. die Niere. Aus diesen Daten kann, wie mir scheint, wohl der Schluss gezogen werden, dass die verminderte Kalkausscheidung im Harn u. Kot und die Hypocalämie bei Zufuhr von Carotin auf der Aufspeicherung von Kalk im Muskel, im Knochen, in der Leber und in der Niere beruht.

Lunge und Herz, besonders die erste, scheinen durch die Wirkung von Carotin entkalkt zu werden; es muss jedoch noch genau weiter untersucht werden, ob der Kalkgehalt der Lunge und des Herzens auch unter Zufuhr von Kalk durch Carotin herabgesetzt wird.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Der Kalkgehalt der Organe und Gewebe von Kaninchen wird durch subeutane Zufuhr von Carotin im Muskel, im Knochen, in der Leber und in der Niere, und zwar in dieser Reihenfolge absteigend, gesteigert, während er durch sie in der Lunge und im Herzen, und zwar ebenfalls in dieser Reichenfolge absteigend, herabgesetzt wird.

Zum Schluss möchte ich nicht verfehlten, Herrn Dr. S. Wada, Direktor der Pädiatrischen Klinik des Zentralhospitals Kurashiki, für die Förderung bei dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

#### LITERATUR.

Bryant, I. E. u. Talbot (1931): Amer. Jl. Phys., **97**, 509.

Clark, E. P. u. Collip, J. B. (1925): Jl. Biolog. Chem., **63**, 461.

Goto, K. (1922): J. Bioch., **1**, 321.

- Heubner, W. (1931): Handbuch d. norm. u. Path. Physiol., **16**, 1416.  
Ishida, I. (1933); J. Bioch., **18**, 479.  
Ishida, I. (1934): J. Bioch., **19**.  
Kuhn R. u. Lederer E. (1931): Ber. deutsch. Chem. Gesell., **64**, 1349.

## STUDIES ON BIOLOGICAL REDUCTION.

### V. The Specificity of Lactic Acid Dehydrogenase.

By

ICHIRO YAMAMOTO.

(From The Laboratory of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, February 21, 1934)

Although lactic acid is an important intermediate product in carbohydrate metabolism its enzymatic breakdown in animal body has been little known until quite recently Banga and Szent-Györgyi (1932) made a valuable contribution that heart or striated muscle oxidised lactic acid under O<sub>2</sub>-consumption into pyruvic acid with aid of a coferment, which was isolated in a somewhat pure state from pigs' heart muscle.

In this case oxygen served as a H<sub>2</sub>-acceptor, so that it can be replaced by methylenblue. Using the methylenblue technique of Thunberg the author studied whether this ferment system is specific for lactic acid or not.

It was found that various organic substances such as *d*-lactic-, fumaric-, malic-,  $\alpha$ -oxyglutaric-, *l*-tartaric- and tartronic acid can be well oxidised.

In this study several interesting points were noticed upon the intimate relationship between the chemical constitution and the H<sub>2</sub>-donator activity of various organic substances.

*First:* The optical rotation has an unsurpassed influence. Namely *d*-lactic acid isolated from beef muscle was found very active but, not at all, *l*-form prepared after the method of J. C. Irvine (1906). On the contrary, of tartaric acid only *l*-form is a good donator, while *d*-form remains inactive. Of malic acid, both optical isomers are equally active.

*Second:* All of the powerful H<sub>2</sub>-donator for this system is  $\alpha$ -oxycarbonic acid with the exception of fumaric acid, which is

known, however, to be easily converted to malic acid by fumarase. It may be interesting to note here that its cis-isomer, namely maleic acid also can be oxidised easily by the same enzym preparation. But in this case, coferment is not indispensable, because in its absence the rate of dye-reduction is nearly equal.

*Third:* The nature of radical R in the compound  $R-\overset{\underset{H}{|}}{C}-COOH$

exerts a profound influence upon the dehydrogenation to  $R-\overset{\underset{O}{=}}{C}-COOH$ ; for instance,  $CH_3$ -radical as in lactic acid converts

the inactive glycolic acid ( $R=H$ ) into active as  $H_2$ -donator, while  $C_6H_5-$  as in mandelic acid or  $C_6H_5-CH_2-$  as in phenyllactic acid bring no improvement. This fact bears a very important relation to certain biological problems. For example, it has been often argued that  $\alpha$ -hydroxy acid can not be an intermediate product of any aminoacid, because its benzoyl derivate can not be oxidised further at all, while benzoyl keto acid can be oxidised with ease. But the generalisation of this finding with the aromatic amino acid over the aliphatic can not be tenable, because the electromere effect of benzol radical upon  $\alpha$ -C- atom differs much from that of the aliphatic.

*Fourth:* The free carboxylgroup seems to be essential for the good  $H_2$ -donator nature of an organic compound. This is substantially proved by the fact that lactic acid ethylester showed itself to be completely inactive. It may perhaps be true that  $H_2$ -donator can be anchored on the enzym surface by means of the free carboxyl radical. This may lead in turn to the activation of H-atom attached to  $\alpha$ -C atom, if the idea advanced by Quastel (1926) on the basis of J. J. Thomson's octate theory of valence electron on chemical reactions is accepted. For instance,  $CH_3$ - and  $OH$ - radicals each have 7 valence electrons, so that it strives to fill up to 8, which results in the recession of H atom from  $\alpha$ -C atom. On the contrary, -COOH group has 17 valence electrons

and therefore, shows a tendency to give up one electron to become a stable octate, which results in the accession of H atom to  $\alpha$ -C atom. On the balance of these effects, we have a stable lactic acid. If such an influence toward  $\alpha$ -C atom of carboxyl radical is diverted because of its attractions for enzym surface, then H-atom becomes labil and is removed when a suitable acceptor exists. It might be acknowledged therefore, that the essential nature of this enzym action is partly explained by this affinity for the carboxyl group.

As additional evidence for this assumption, the effect of oxalic acid and others is here worthy of mention. Oxalic acid exhibits an extremely strong inhibiting influence upon the dehydrogenation of lactic acid by this ferment system. This influence, however, is not so apparent in the case of malic acid. This behavior of oxalic acid might be explained by assuming that the whole of the active surface of the ferment is occupied by the carboxyl group of oxalic acid, resulting in the complete exclusion of lactic acid. Malic acid, being dibasic, may well compete for absorption with oxalic acid, so that compared with lactic acid, it is less affected by the presence of oxalic acid. Malonic acid is also inhibitory, but dibasic organic acids such as glutaric-, adipinic-, and cork acids are less toxic.

#### EXPERIMENTAL.

##### 1. Preparation of the lactodehydrogenase and its coferment.

As a ferment, preparate pigs' hearts-muscle was used. Since it contains a number of natural H<sub>2</sub>-donators, it was minced by chop machine and thoroughly washed in running water for 3 hours, followed by repeated washing with distilled water. Then it was squeezed out between filter papers. An aliquot portion was weighed out, ground up in mortar with aid of purified sea sand and finally made into paste by adding a sufficient amount of M/15 phosphate buffer (10 cc. for 1 gm. muscle).

The coferment was prepared from pigs' heart muscle by the method described by Banga and Szent-Györgyi (1932) and used as 0.1% watery solution.

*2. The method of determining the activity of H<sub>2</sub>-donator.*

The Thunberg's methylenblue technique was used throughout the experiments. Into the vacuum tube were introduced 1.0 cc. of the muscle paste, 0.5 cc. of the coferment solution, 0.2 cc. of methylenblue solution (*M*/10000) and 0.8 cc. of H<sub>2</sub>-donator under testing. The tube was evacuated for 2 minutes, then placed in a thermostat kept at 37°C and the time for complete decolorization from the beginning of exhaustion was measured. As the controls, 2 similar experiments, one without donator and the other without coferment, were carried out.

*3. The H<sub>2</sub>-donator activity of various organic substances.*

All of the tested substances were used as 0.1 M watery solution, neutralised by alkali if necessary. In preparation of 0.1 M solution of Na-lactate, caution was paid to hydrolyse lactic acid anhydrid by boiling previously with ten times water. Then it was neutralized while hot with alkali (Laemus) and after being cooled, its lactate contents were determined by the method of Mendel und Goldscheider (1925) and diluted exactly to 0.1 M with water.

The results are summarized in Table 1.

*4. The comparision of optical antipodes as H<sub>2</sub>-donator.*

*d-, l- and dl-lactic acid.*

The former was freshly prepared from beef in the usual manner, and *l*-lactic acid by the method of J. C. Irvine. It was found that *d*-lactic acid only was a good donator, whereas *l*-lactic acid was quite inactive. Comparing *d*-lactic acid and *dl*-lactic acid, nearly the same decolorization times were observed when the concentrate of the latter was doubled as expected (Table II).

*d-, l-, and dl-malic acids.*

As *l*- and *dl*-malic acids were used, Merks preparate. *d*-Form was prepared by isolating as cinchonin compound from *dl*-form and crystallised as ammonium salt.  $[\alpha]_D^{25}$  of the obtained salt was +6.1. The results are indicated in Table III.

TABLE I.  
H<sub>2</sub>-donator activity of various organic substances.

	Donator	Reduction time	Without donator	Without coferment
Active	Lactic acid	5' 07"	45'	>45'
	Malic acid	5' 25'	45'	>45'
	<i>l</i> -Tartaric acid	5' 50"	50'	>50'
	$\alpha$ -Oxyglutaric acid	5' 40"	45'	18'
	Fumaric acid	5' 15"	45'	>45'
	Tartaric acid	15'	40'	>40'
	$\beta$ -Oxybutyric acid	14'	45'	>45'
	Citric acid	23'	45'	>45'
	Glycerinaldehyde	16' 20"	45'	28.
	Glycerinic acid	23'	45'	>45.
	Xylose	25'	45'	>45'
	Glucose	23'	45,	>45'
	Dioxycetone	9'	45'	16'
	Pyruvic acid	11' 0"	45'	

Inactive formic acid, acetic acid, propionic acid, butyric acid, isovaleric acid, glycolic acid, oxalic acid, malonic acid, glutaric acid, adipic acid, cork acid, erontic acid, lävulinic acid, mandelic acid, oxyphenyllactic acid, phenyllactic acid, formaldehyde, benzaldehyde, arabinose, galactose, levulose, Mannose, glycuronic acid,  $\alpha$ -alanin, leucinie acid.

TABLE II.  
Comparison of H<sub>2</sub>-donator activity of *d*-, and *dl*-lactic acids.

Lactic acid	Concentration in M	Reduction time
<i>dl</i>	0.1	5' 07"
<i>d</i>	0.05	5' 15"
<i>dl</i>	0.05	5' 30"
<i>d</i>	0.025	5' 30"
<i>dl</i>	0.01	8'
<i>d</i>	0.005	9'
<i>dl</i>	0.001	18'
<i>d</i>	0.0005	18'
<i>l</i>	0.1	40'

TABLE III.  
Comparison of H<sub>2</sub>-donator activity of *d*-, *l*- and *dl*-malic acids.

Decolorization time				
Concentration in M	0.1	0.01	0.001	0.0001
<i>d</i> -malic acid	6' 20"	9'	13'	21'
<i>l</i> -,,	6' 5"	8.	10' 15"	20'
<i>dl</i> -,,	4' 10"	--	--	--

*l*-malic acid seems a little more active than *d*-form, but in contrast to lactic acid, both optical isomers are equally good H<sub>2</sub>-donator.

#### *d*- and *l*-tartaric acids.

Merks preparate of both forms was used. The results are given in Table IV.

TABLE IV.

<i>d</i> -tartaric acid	60' —
<i>l</i> -tartaric acid	5' 50"
Control	60' —

#### 5. Comparison of the H<sub>2</sub>-donator activity of stereoisomers, fumaric acid and maleic acid.

It is an interesting fact that fumaric acid serves as a good H<sub>2</sub>-donator for this ferment system. Under the given condition, it was converted to malic acid by means of fumarase. Its cis-isomer, maleic acid, was proved also as an equally powerful H<sub>2</sub>-donator. But in this case the coferment is not necessary, as is shown in the following example.

	With coferment	Without coferment
Fumaric acid	5' 05"	>60'
Maleic acid	5' 10"	5' 10"

From this behavior it might well be anticipated that maleic acid is not simply a stereoisomer of fumaric acid.

6. *The effect of esterification of lactic acid upon the H<sub>2</sub>-donator activity.*

If the free carboxyl group of lactic acid is necessary to be a good H<sub>2</sub>-donator, as discussed in the foregoing experiment, then the esterification may result in complete inhibition. This is exactly the case, as is shown in Table V. The lactic acid ethylester was prepared by the method of Wislicenus (1863) and used as 0.1 M solution.

TABLE V. The effect of Esterification.

	Decolorisation time	
Lactic acid	1) 11' 0"	2) 13' 0"
Lactic acid ethylester	1) 130' 0"	2) 150' 0"
Controls	>150'	

#### SUMMARY.

Using the Thunberg's methylenblue technique, the following points were noticed.

1. The lactic acid dehydrogenase system (washed pig's heart muscle+coferment) a number of  $\alpha$ -oxy acids such as malic-, tartaric and  $\alpha$ -oxyglutaric acid can be as well oxidized as lactic acid.
2. Of the optical isomers *d*-lactic acid only can be oxidized, while *l*-lactic acid remains inactive. With regard to tartaric acid, *l*-form is rather active, while *d*-form is not. Of malic acid, both forms are active.
3. Fumaric- and maleic acids also can be well oxidized by this system, but with the latter, coferment is not indispensable.
4. Oxalic- and malonic acid are powerful inhibitors for lactic acid oxidation by this system but not so much so for malic acid.
5. Esterification of lactic acid renders the acid quite inactive.

## REFERENCES.

- Banga u. Szent-Györgyi (1932): Biochem. Zs., **246**, 203.  
Irvine (1906): Jl. of the chem. soc., **89**, 935.  
Mendel u. Goldscheider (1925): Biochem. Zs., **164**, 163.  
Quastel (1926): Biochem. Jl., **20**, 166.  
Thomson (1923): The electron in chemistry.  
Wislicenus (1863): Ann. d. Chem., **125**, 41.

# ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DIE SYNTHESE DER PHENOLSCHWEFELSÄURE IM TIERISCHEN ORGANISMUS.

VON

ISOKICHI OKII.

(*Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

Seit E. Baumann (1876) ist allgemein anerkannt, dass Phenol, P-Kresol, Indoxyl u. Skatoxyl im Tierkörper entgiftet unter Paarung mit Schwefelsäure oder Glukuronsäure im Harn ausgeschieden werden. Diese Ätherschwefelsäure im Harn soll nach Tauber (1895) durch gleichzeitige Zufuhr von Sulfit und Phenol, nach Sato (1909) u. Rhode (1923) durch die von Cystin, Taurin u. Sulfit vermehrt werden, nicht aber durch die von Sulfat od. Thiosulfat, während sie nach Katsuyama (1901/02) durch Kohlenoxyd- od. Amylnitritvergiftung herabgesetzt wird.

Die Synthese der Ätherschwefelsäure soll, wie man seit Embden (1902) annimmt, in der Leber stattfinden und mit der Funktion der Leberzellen eng verknüpft sein. Diese entgiftende Funktion der Leberzellen soll nach vielen Autoren (wie Best 1903, Graham 1914, Tada 1926, Ikushima 1929 usw.) mit dem Glykogengehalt der Leber in innigem Zusammenhang stehen.

Die Glykogenbildung der Leberzellen wird durch Gallensäure gefördert, die, wie von vielen Autoren (wie Misaki 1928, Fuzita 1931/32, Chikamori 1930, Teraoka 1932 usw.) bewiesen wurde, in der Leber gebildet wird. Somit muss die Gallensäure die Leberfunktion, und besonders ihre Entgiftungsfähigkeit, steigern, wie Hasegawa u. Naito (1927) beim Versuch mit Insulin, welches bekanntlich die Glykogenbildung in der Leber fördert, beobachtet haben. Im obigen Sinne habe ich nun den Einfluss der Cholsäure auf die Ausscheidung der Ätherschwefelsäure im Harn unter Zufuhr von Phenol untersucht.

### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuche wurden kräftig entwickelte männliche Kaninchen verwendet, welche wenigstens eine Woche lang mit einer bestimmten Menge von Okara, Gemüse und Wasser gefüttert worden waren. Erst nachdem das Körpergewicht und die Harnmenge des Tieres konstant geworden war, wurde der Versuch begonnen. Während des ganzen Versuches wurde die gleiche bestimmte Nahrung täglich morgens nach der Katheterisierung des Harns verabreicht.

Der Harn wurde täglich von 8 Uhr morgens bis 8 Uhr des nächsten Morgens durch Katheterisierung sorgfältig gesammelt. Nachdem die Menge, das spezifische Gewicht und die Reaktion des Harns festgestellt worden waren, wurde der Harn samt dem Waschwasser des Käfigs mit verdünnter Essigsäure angesäuert, um die Trübung aufzuklären, und mit Wasser zu einem bestimmten Volumen verdünnt und klar abfiltriert. Mit dem Harn wurde der Gehalt an Äther- und Sulfatschwefelsäure nach der Vorschrift von Salkowski bestimmt. Der Versuch wurde in drei Perioden: Vor-, Nach- und Versuchsperiode geteilt.

In der Versuchsperiode habe ich zuerst 0,6–0,9 g Phenol (Merk) pro Kaninchen als 2%ige, wässrige Lösung, in 2–3 Portionen geteilt, zu je 15 cem den Kaninchen um 10 Uhr morgens, 1 und 4 Uhr nachmittags oder um 10 Uhr morgens und 5 Uhr nachmittags subcutan injiziert. Dann wurde die Äther- u. Sulfatschwefelsäure im täglichen Harn bestimmt, um den Einfluss der Phenolinjektion auf die Ätherschwefelsäureausscheidung festzustellen.

Nach Beendigung dieses Versuches liess man das Kaninchen 1–3 Wochen lang bis zum nächsten Versuch im Käfig ruhen. Dann wurde der Versuch bei demselben Tier wiederholt, und zwar wurden in der Versuchsperiode 2 Stunden vor der Injektion der Phenollösung dem Kaninchen 2 cem einer 1%igen Na-Cholatlösung pro Kilo subcutan oder 2 cem einer 10%igen Na-Cholatlösung pro Kilo peroral verabreicht. Dann wurde der Harn in der gleichen Weise wie oben genau untersucht. Der Ätherschwefelsäuregehalt

des Harns bei beiden Versuchen wurde unter Zufuhr von Phenol ohne oder mit Cholsäure verglichen, um den Einfluss der Cholsäure auf die Phenolentgiftung beim Kaninchen zu erkennen. Einen Versuch habe ich in umgekehrter Anordnung vorgenommen.

Der Wert des im Harn vermehrten gepaarten Phenols, ausgedrückt in Prozenten der eingeführten Phenolmenge, wird als der entgiftende Prozentsatz bezeichnet, damit man über den Paarungsgrad des Phenol mit Schwefelsäure ein klares Bild gewinnen kann.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I-III zusammengestellt.

TABELLE I.

Datum	Körper-gew.	Harn-menge	Spez. gew.	Äther-schwefel-säure: mg	Sulfat-schwefel-säure: mg	Entgiftungs-prozentsatz	Bemerk.
16/IX	2410	130	1015	25,38	84,30	16,2 %	Phenol subcutan
17/ "	2420	200	1017	177,70	29,61		
18/ "	2380	190	1013	42,39	29,61		
7/X	2385	210	1011	22,25	78,39	18,5 %	Phenol u. Cholsäure subcutan
8/ "	2430	190	1017	195,80	11,51		
9/ "	2430	210	1015	20,54	31,12		
22/X	2450	167	1014	19,09	63,43	19,2 %	Phenol u. Cholsäure peroral
23/ "	2460	230	1014	199,52	11,45		
24/ "	2470	170	1014	11,78	60,92		

TABELLE II.

Datum	Körper-gew.	Harn-menge	Spez. gew.	Äther-schwefel-säure: mg	Sulfat-schwefel-säure: mg	Entgiftungs-prozentsatz	Bemerk.
20/IX	2090	175	1010	19,52	95,90	16,0 %	Phenol u. Cholsäure subcutan
21/ "	2050	131	1030	119,45	16,49		
22/ "	2040	150	1020	17,19	48,79		
27/ "	2030	190	1013	13,46	78,74	12,9 %	Phenol subcutan
28/ "	2030	210	1013	94,15	19,09		
29/ "	2035	218	1012	22,87	142,07		
12/X	2010	150	1015	9,05	81,61	18,1 %	Phenol u. Cholsäure peroral
13/ "	2020	195	1013	122,50	29,44		
14/ "	2020	185	1012	8,75	41,39		

TABELLE III.

Datum	Körpergew.	Harmen- menge	Spez. gew.	Äther- schwefel- säure: mg	Sulfat- schwefel- säure: mg	Entgiftungs- prozentsatz	Bemerk.
31/X	2315	130	1020	20,85	100,94	13,8 %	Phenol subcutan
1/XI	2365	100	1025	150,07	16,75		
2/ „	2350	125	1016	12,95	67,46		
6/XII	2220	120	1023	16,15	126,55	16,0 %	Phenol subcutan u. Cholsäure per os
7/ „	2225	125	1020	166,55	10,85		
8/ „	2250	140	1018	12,77	102,29		

Aus den Tabellen I-III ist ersichtlich, dass die Tagesmenge der im Harn ausgeschiedenen Ätherschwefelsäure in der Vorperiode 9,05–25,38 mg, und dass die der Sulfatschwefelsäure 63,43–126,55 mg beträgt, während die erstere bei Zufuhr von Phenol mit 94,15–177,7 mg und die letztere mit 16,75–29,61 mg gezeigt wird. Das eingeführte Pheonl wird also zu 12,9–16,2% gepaart im Harn ausgeschieden. Bei Zufuhr von Phenol wird demnach die gepaarte Schwefelsäure vermehrt, die Sulfatschwefelsäure dagegen stark vermindert im Harn ausgeschieden.

Bei subcutaner Zufuhr von Cholsäure mit Phenol wird die Tagesmenge der Ätherschwefelsäure im Harn mit 119,45–195,80 mg gezeigt. Der entgiftende Prozentsatz beträgt dabei 16,0–18,5%. Die Phenolentgiftung wird also durch subcutanè Zufuhr von Cholsäure gefördert, und der entgiftende Prozentsatz ist um 14,2–24,0% höher als bei dem Kontrollversuch. Die Tagesmenge der Sulfatschwefelsäure im Harn bei Zufuhr von Cholsäure mit Phenol wurde aber weit geringer gefunden als bei dem Kontrollversuche.

Bei peroraler Zufuhr von Cholsäure mit Phenol wurde die Tagesmenge der Ätherschwefelsäure im Harn mit 122,5–199,52 mg gezeigt. Die Ausscheidung der Ätherschwefelsäure im Harn wurde also stark vermehrt, und der entgiftende Prozentsatz liegt zwischen 16,0% und 19,2%. Diese Prozentziffer ist um 15,9–40,3% höher als bei dem Kontrollversuch.

Die Ausscheidung der Äther- u. Sulfatschwefelsäure im Harn

in der Nachperiode ist fast ebenso gross wie die in der Vorperiode.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Cholsäure sowohl bei subcutaner als auch bei peroraler Zufuhr die Synthese der Phenolschwefelsäure im Kaninchenorganismus deutlich fördert. Diese entgiftende Funktion tritt bei peroraler Zufuhr von Cholsäure im allgemeinen stärker auf als bei subcutaner. Aus den Daten kann wohl der Schluss gezogen werden, dass die Gallensäure die Glykogenbildung in der Leber fördert, was unter Aktivierung der Leberfunktion eine gesteigerte entgiftende Funktion der Leber zur Folge hat, wie es auch beim Insulin der Fall ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die subcutane Zufuhr von Phenol führt beim Kaninchen eine Vermehrung der Ätherschwefelsäure im Harn herbei.
2. Die Synthese der Ätherschwefelsäure aus Phenol im Kaninchenorganismus wird sowohl durch subcutane als auch durch perorale Zufuhr von Cholsäure gesteigert, da die Ausscheidung der Ätherschwefelsäure im Harn durch diese vermehrt wird. Somit scheint mir die Gallensäure unter vermehrter Glykogenbildung die entgiftende Funktion der Leber zu steigern.

#### LITERATUR.

- Baumann, E. (1876): Pflüger's Arch., **13**, 285.  
Best, Fr. (1903): Ziegler's Beiträge, **33**, 585.  
Chikamori, S. (1930): Okayama Igakkai Zasshi, Nr. 487, 1963.  
Emden, G. u. Glässner, K. (1902): Hofmeister's Beiträge, **1**, 310.  
Fuzita, S. (1932): Arb. aus d. Med. Univ. Okayama, **3**, 192.  
Fuzita, S. (1931): Jl. of Bioch., **13**, 219.  
Graham, E. A. (1914): Jl. of exp. Med., **21**, 185.  
Hasegawa, S. u. Naito, G. (1927): Osaka Igakkai Zasshi, **26**, 681.  
Ikushima, J. (1929): Jl. of Gastroenterol., **4**, 972.  
Katsuyama, K. (1901/02): Zschr. Physiol. Chem., **34**, 83.  
Misaki, K. (1928): Jl. of Bioch., **8**, 235.  
Rhode, H. (1923): Zschr. Physiol. Chem., **124**, 15.  
Sato, T. (1909): Zschr. Physiol. Chem., **63**, 378.  
Tada, Y. (1926): Jl. of Gastroenterol., **1**, 11.  
Tauber, S. (1895): Pflüger's Arch., **36**, 197.  
Teraoka, M. (1932): Bioch. Zschr., **249**, 195.



## BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLE-HYDRATSTOFFWECHSEL. XXX.

**Einfluss der Gallensäure auf die Glykogenbildung aus den Fettsäuren in der Leber.**

VON

ISOKICHI OKII.

(*Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

Es ist allgemein bekannt, dass das Glykogen in der Leber nicht nur aus Zucker u. Aminosäuren, sondern auch aus Fettsäuren gebildet wird. Nach den Untersuchungen von Fuzita (1932) u. Yuuki (1932) soll das Glykogen in der Kaninchenleber durch Zufuhr von Gallensäure auch nach vier Tage langem Hungern gebildet werden, obwohl in diesen Tagen die Leber fast frei von Glykogen ist. Somit muss die Glykogenbildung in der Leber des hungernden Tieres bei Zufuhr von Gallensäure entweder aus Eiweiss oder aus Fett stattfinden. Es wurde schon von Fuzita (1932) bewiesen, dass das Glykogen in der Leber des hungernden Tieres bei Zufuhr von Gallensäure zum Teil aus Eiweiss bzw. Aminosäuren gebildet wird. Diesmal habe ich die Glykogenbildung aus höheren Fettsäuren in der Hunger-Leber bei Zufuhr von Cholsäure untersucht.

### EXPERIMENTELLER TEIL.

Kräftige, mittelgrosse, männliche Kaninchen, die lange Zeit mit bestimmter Nahrung gefüttert worden waren, wurden 4 Tage lang in Hunger gehalten.

Der ersten Gruppe von diesen Tieren wurde 1 g fettsaures Natrium: Palmitinsäure, Stearinsäure u. Oleinsäure pro Kilo als 2%ige Seifenlösung per os mittelst Schlundsonde verabreicht. Der zweiten Gruppe wurden 0,3 g Natriumcholat pro Kilo mit der Seifenlösung per os gegeben. 4 Stunden nach der Zufuhr der

Seifen wurden die Tiere beider Gruppen einzeln durch Nackenschlag und Verbluntung aus der Carotis getötet; die schnell herausgeholt Leber wurde genau abgewogen.

Das Glykogen der Leber wurde nach Iwasaki u. Moor (1926) unter Hydrolyse in Zucker verwandelt, der nach Bertrand bestimmt und als Glykogen berechnet angegeben wurde.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I-VI zusammengefasst.

### 1. Bei Zufuhr von Fettsäuren.

Wie aus den Tabellen I-III ersichtlich ist, beträgt der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Stearinsäure durchschnittlich 0,796%, bei der von Palmitinsäure 0,954% und bei der von Oleinsäure 0,965%.

Nach Yuuki (1932) beträgt der Glykogengehalt der Leber eines 4 Tage hungernden Kaninchens durchschnittlich 0,258%; dieser wurde unter genau den gleichen Bedingungen und mit der

TABELLE I.  
(beim Stearinsäureversuch).

Datum	Nr.	Körpergewicht		Leber- gewicht: g	Leberglykogen	
		vor dem Hunger: g	nach dem Hunger: g		g	%
21/IV	1	1930	1710	38,0	0,3128	0,823
"	2	2150	1900	40,5	0,5372	1,326
"	3	2040	1780	38,7	0,2132	0,551
23/IV	4	2130	1780	27,5	0,4412	1,604
"	5	2020	1780	40,0	0,1706	0,424
25/IV	6	2110	1710	38,5	0,1412	0,367
"	7	2000	1760	32,3	0,2420	0,749
"	8	2140	1810	29,5	0,2132	0,723
27/IV	9	2130	1930	47,0	0,1706	0,363
"	10	1750	1580	36,0	0,3699	1,028
Durchschnittswert					0,2812	0,796

gleichen Methode bestimmt. Die Glykogenbildung der Hunger-Leber aus Stearinsäure wird also um 169,7%, die aus Palmitinsäure um 269,8% und die aus Oleinsäure um 274%, vermehrt.

In der Hunger-Leber wird demnach, wie bekannt, das Glykogen aus Fettsäuren gebildet, und diese Glykogenbildung aus Palmitinsäure oder Oleinsäure tritt viel stärker auf als die aus Stearinsäure.

TABELLE II.  
(beim Palmitinsäureversuch).

Datum	Nr.	Körpergewicht		Leber- gewicht: g	Leberglykogen	
		vor dem Hunger: g	nach dem Hunger: g		g	%
30/V	1	2040	1730	37,0	0,4557	1,232
1/V	2	1980	1780	35,8	0,4838	1,351
"	3	1940	1470	30,5	0,1993	0,653
3/V	4	1840	1560	37,9	0,2278	0,601
"	5	2090	1600	32,4	0,3416	1,543
5/V	6	1790	1530	32,1	0,1706	0,531
"	7	1980	1870	33,2	0,3987	1,201
7/V	8	2040	1980	38,2	0,1560	0,408
"	9	1880	1700	31,2	0,2824	0,905
9/V	10	1960	1590	31,9	0,3557	1,115
Durchschnittswert					0,3072	0,954

TABELLE III.  
(beim Oleinsäureversuch).

Datum	Nr.	Körpergewicht		Leber- gewicht: g	Leberglykogen	
		vor dem Hunger: g	nach dem Hunger: g		g	%
29/V	1	1930	1630	35,0	0,4146	1,185
"	2	2040	1700	30,8	0,2419	0,784
30/V	3	1800	1500	28,0	0,3987	1,424
"	4	1980	1740	34,7	0,2419	0,697
31/V	5	1900	1500	27,0	0,2278	0,844
1/VI	6	2150	1880	46,7	0,2445	0,524
"	7	1780	1690	32,7	0,4557	1,394
2/VI	8	1880	1710	36,4	0,2278	0,626
"	9	2000	1810	34,2	0,2721	0,796
3/VI	10	1640	1480	30,1	0,4146	1,377
Durchschnittswert					0,3140	0,965

*2. Bei Zufuhr von Fettsäuren mit Cholsäure.*

Nach den Tabellen IV-VI beträgt der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Stearinsäure mit Cholsäure durchschnittlich 1,21% bei der von Palmitinsäure mit Cholsäure 1,148% und bei der von Oleinsäure mit Cholsäure 1,236%.

Die Glykogenbildung aus höheren Fettsäuren in der Hungerleber wird also durch Mitzufuhr von Cholsäure stark gesteigert, und gegenüber der Steigerung bei Zufuhr von Fettsäuren allein wird sie bei Stearinsäure um 52,0%, bei Palmitinsäure um 20,3% und bei Oleinsäure um 28,1% vermehrt.

Auf Grund der obigen Ergebnisse lässt sich wohl der Schluss ziehen, dass die Neubildung des Glykogens in der Leber des hungernden Kaninchens bei Zufuhr von Gallensäure durch eine die Glykogenbildung aus Aminosäuren sowie aus Fettsäuren fördernde Wirkung der Gallensäure bedingt ist.

TABELLE IV.  
(beim Stearinsäure-Cholsäure-Versuch).

Datum	Nr.	Körpergewicht		Leber- gewicht: g	Leberglykogen	
		vor dem Hunger: g	nach dem Hunger: g		g	%
21/IV	1	1900	1610	30,0	0,5128	1,709
	2	2160	1950	32,2	0,5678	1,761
23/IV	3	2000	1720	38,0	0,4948	1,302
	4	2020	1810	39,5	0,1706	0,432
25/IV	5	2030	1950	32,5	0,5128	1,578
	6	2000	1710	35,9	0,6280	1,749
27/IV	7	2040	1510	31,3	0,2445	0,781
	8	2150	1890	48,0	0,2419	0,504
"	9	1980	1680	44,0	0,2607	0,593
	10	1830	1670	32,0	0,5406	1,689
Durchschnittswert					0,4175	1,210

TABELLE V.  
(beim Palmitinsäure-Cholsäure-Versuch).

Datum	Nr.	Körpergewicht		Leber- gewicht: g	Leberglykogen	
		vor dem Hunger: g	nach dem Hunger: g		g	%
30/IV	1	2120	1900	35,2	0,3557	1,011
1/V	2	2110	1780	44,7	0,3120	0,698
"	3	2080	1730	35,7	0,5372	1,505
3/V	4	1870	1700	31,4	0,3699	1,178
5/V	5	1780	1550	31,0	0,2607	0,841
"	6	1980	1800	35,7	0,2824	0,791
7/V	7	2000	1760	35,5	0,3557	1,002
"	8	2080	1820	35,4	0,3841	1,085
9/V	9	1910	1640	36,1	0,6544	1,812
"	10	2010	1640	37,4	0,5835	1,559
Durchschnittswert					0,4096	1,148

TABELLE VI.  
(beim Oleinsäure-Cholsäure-Versuch).

Datum	Nr.	Körpergewicht		Leber- gewicht: g	Leberglykogen	
		vor dem Hunger: g	nach dem Hunger: g		g	%
29/V	1	1870	1520	34,6	0,4838	1,398
"	2	2000	1610	34,9	0,3841	1,101
30/V	3	2080	1880	31,7	0,3987	1,258
31/,,	4	2020	1870	34,8	0,4412	1,268
1/VI	5	2010	1600	33,0	0,4557	1,381
"	6	2000	1830	41,2	0,4146	1,006
2/,,	7	1780	1500	32,9	0,3987	1,212
"	8	1800	1500	40,7	0,3120	0,767
3/,,	9	1650	1450	31,9	0,4412	1,383
"	10	1810	1600	29,6	0,4694	1,585
Durchschnittswert					0,4199	1,236

## ZUSAMMENFASSUNG.

Die Glykogenbildung der Leber aus höheren Fettsäuren: Stearinsäure, Palmitinsäure u. Oleinsäure wird durch Zufuhr von Cholsäure stark gefördert.

## LITERATUR.

Fuzita, S. (1932): Arb. aus d. Med. Univ. Okayama, 3, 192.

Yuuki, H. (1932): Jl. of Bioch., 15, 373.

Iwasaki, K. u. Moorì, M. (1926): Praxis v. Physiol. Chem. Kursus nach Sudo, Aufl., 11, 334.

## DER EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DIE SALZAUSSCHEIDUNG IN DER LEBERGALLE. IV.

### Ammoniakausscheidung in der Galle bei Zufuhr von Gallensäure.

VON

YUTAKA KAWADA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

Durch die Untersuchungen von Karasawa (1926) u. Tanaka (1933) wurde bewiesen, dass bei der Autolyse von Hoden die Nucleinsäurespaltung durch Gallensäure gefördert wird. Neuerdings hat Okamura (1930) den Nachweis erbracht, dass die Wirkung der Lebernucleinase durch Cholsäure unter Spaltung der Phosphorsäure aus Nucleinsäure aktiviert wird.

Der Nucleinstoffwechsel der Leber muss also durch Gallensäure bei deren enterohepatischen Kreislauf immer gefördert werden. Nun ist es im allgemeinen bekannt, dass die Nucleinsäurespaltung in der Leber unter Desaminierung stattfindet. In diesem Sinne dürfte also die Wirkung der Desamidase durch Gallensäure unter vermehrter Ammoniakspaltung aus Nucleinsäure aktiviert werden.

Um den Mechanismus der Wirkung von Gallensäure auf den Nucleinstoffwechsel in der Leber klarzustellen, habe ich zuerst die Ammoniakausscheidung in der Galle unter dem Einfluss der Cholsäurewirkung untersucht. Damit scheint mir die Pufferfähigkeit der Galle gekennzeichnet zu werden, weil nach Itoo (1930, 1932) die Alkalireserve der Galle vom Hunde durch Zufuhr von Gallensäure erhöht und der PH der Galle dadurch gesteigert wird.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurde dem Hunde eine permanente Gallen-

blasenfistel nach Bickel angelegt. Nachdem sich der Hund von der Operationswunde erholt hatte, wurde der Versuch ausgeführt. Während des Versuches wurde eine bestimmte Nahrung täglich zu bestimmter Zeit verabreicht. Morgens früh wurde die Galle aus der Gallenblasenfistel in die Glaskugel 6 Stunden lang gesammt, und dann die Nahrung verfüttert.

Ausserhalb der Sammlungszeit der Galle liess man den Hund seine eigene Galle ruhig ablecken.

Der Versuch wurde in drei Perioden: Vor-, Nach- und Versuchsperiode geteilt; in der Versuchsperiode wurden dem Hunde 0,05 g Cholsäure pro Kilo mit oder ohne 2 g Hefenucleinsäure pro Kilo per os verabreicht, um den Einfluss der Cholsäure auf den Nucleinstoffwechsel festzustellen.

Als Kontrolle wurden 2 g Hefenucleinsäure allein pro Kilo in der Versuchsperiode per os verabreicht.

In allen Perioden wurden die Gallenmenge von 6 Stunden und der Ammoniakgehalt der Galle untersucht und miteinander verglichen. Die Bestimmung des Ammoniaks in der Galle wurde nach Krüger-Reich (1903) ausgeführt, genau wie beim Harn.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

### *1. Bei Zufuhr von Cholsäure.*

Aus den Tabellen I. u. II. lässt sich ersehen, dass die Gallensekretion, wie bekannt, durch Zufuhr von Cholsäure gefördert wird, und zwar wurde die Gallenmenge im Vergleich zu der durchschnittlichen Menge in der Vorperiode um 11,3–27,7%, und verglichen mit der in der Nachperiode um 23,1–34,7% vermehrt.

Was den Ammoniakgehalt der Galle bei Zufuhr von Cholsäure anbetrifft, so wurde gefunden, dass er der absoluten Menge nach, verglichen mit dem durchschnittlichen Wert in der Vorperiode um 21,5–49,2%, und verglichen mit dem in der Nachperiode um 26,5–42,5% vermehrt wird, während er in 2 Fällen prozentual im Vergleich zu dem durchschnittlichen Wert in der Vorperiode um 9,9–35,1% vermehrt, aber in 2 anderen Fällen um 2,3–2,7% vermindert wird, und gegenüber dem der Nachperiode

TABELLE I.

Hund Nr. 1, Körpergewicht 5 kg.

(Futter: Reis 150 g, trockner Fisch 60 g, Gemüse 60 g,  
Soyasuppe 15 cem, Wasser 600 cem)

Datum	Gallenmenge cem	Ammoniak		Bemerkungen
		mg	mg%	
10/X	28	1,488	5,314	
11/ „	26	1,360	5,231	
12/ „	29	1,403	4,838	
13/ „	30	1,445	4,817	
14/ „	33	1,998	5,550	← Cholsäure 0,25 g
15/ „	27	1,360	5,037	
16/ „	32	1,530	4,781	
17/ „	30	1,445	4,417	
18/ „	28	1,275	4,554	

Hund Nr. 2, Körpergewicht 6 kg.

(Futter: Reis 150 g, trockner Fisch 60 g, Gemüse 60 g,  
Soyasuppe 15 cem, Wasser 600 cem)

15/XI	27	2,253	8,346	
16/ „	25	2,083	8,332	
17/ „	27	2,210	8,185	
18/ „	24	2,125	8,854	
19/ „	32	2,635	8,234	← Cholsäure 0,3 g
20/ „	25	2,338	9,350	
21/ „	26	2,125	8,172	
22/ „	23	1,931	8,317	
23/ „	23	1,955	8,500	

in 2 Fällen um 9,9–15,7% vermehrt, aber in 2 anderen Fällen um 2,0–4,1% vermindert wird.

Die Ammoniakausscheidung in der Galle wird also durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert. Dies scheint mir auf der den Nucleinstoffwechsel der Leber fördernden Wirkung der Cholsäure

TABELLE II.

Hund Nr. 3, Körpergewicht 15 kg.

(Futter: Reis 250 g, trockner Fisch 100 g, Gemüse 100 g,  
Sojasuppe 25 cem, Wasser 1000 cem.)

Datum	Gallenmenge cem	Ammoniak		Bemerkungen
		mg	mg%	
26/XI	45	0,595	1,322	
27/ "	42	0,468	1,113	
28/ "	42	0,425	1,012	
29/ "	40	0,404	1,010	
30/ "	47	0,707	1,505	← Cholsäure 0,75 g
1/XII	39	0,531	1,362	
2/ "	39	0,595	1,526	
3/ "	37	0,510	1,378	
4/ "	35	0,425	1,214	

Hund Nr. 2, Körpergewicht 6 kg.

(Futter: Reis 150 g, trockner Fisch 60 g, Gemüse 60 g,  
Sojasuppe 15 cem, Wasser 600 cem.)

1/XII	26	2,083	8,115	
2/ "	27	2,040	7,556	
3/ "	25	1,955	7,820	
4/ "	27	1,998	7,400	
5/ "	33	2,480	7,515	← Cholsäure 0,3 g
6/ "	26	1,998	7,654	
7/ "	25	1,913	7,652	
8/ "	23	1,743	7,578	
9/ "	24	1,870	7,792	

zu beruhen. Um diese Frage zu lösen, habe ich folgenden Versuch ausgeführt:

## 2. Bei Zufuhr von Cholsäure mit Nucleinsäure.

Diesmal wurde den Gallenfistelhunden Hefenucleinsäure ohne oder mit Cholsäure per os verabreicht.

TABELLE III.

Hund Nr. 2, Körpergewicht 6 kg.

(Futter: Reis 150 g, trockner Fisch 60 g, Gemüse 60 g,  
Sojasuppe 15 ccm, Wasser 600 ccm.)

Datum	Gallenmenge ccm	Ammoniak		Bemerkungen
		mg	mg %	
10/ I	30	1,870	6,233	
11/ „	28	1,828	6,528	
12/ „	25	1,615	6,460	
13/ „	31	1,870	6,032	
14/ „	33	1,700	5,152	← Nucleinsäure 12 g
15/ „	33	1,658	5,024	
16/ „	30	1,615	5,383	
17/ „	33	1,615	4,894	
18/ „	38	2,040	5,368	← Nucleinsäure 12 g Cholsäure 0,3 g
19/ „	28	1,530	5,464	
20/ „	25	1,445	5,780	
21/ „	27	1,445	5,352	
22/ „	25	1,403	5,612	

Aus den Tabellen III—V ist ersichtlich, dass die Gallenmenge durch Zufuhr von Hefenucleinsäure im allgemeinen vermehrt, und dass diese Vermehrung durch Mitzufuhr von Cholsäure weiter verstärkt wird.

Der absolute Ammoniakgehalt der Galle bei Zufuhr von Hefenucleinsäure wird im Vergleich mit dem durchschnittlichen Wert der Vorperiode in einem Fall um 5,3% vermindert, aber in 2 Fällen um 5,7–11,5% vermehrt, und gegenüber dem der Nachperiode um 1,8–9,0% vermehrt, während er bei Mitzufuhr von Cholsäure, verglichen mit dem durchschnittlichen Wert der Vorperiode, um 25,5–89,2% und gegenüber dem der Nachperiode um 31,8–110,7% vermehrt wird. Diese vermehrte Ammoniakausscheidung in der Galle tritt bei Zufuhr von Hefenucleinsäure mit Cholsäure viel stärker auf als bei Zufuhr von Cholsäure allein.

TABELLE IV.

Hund Nr. 4, Körpergewicht 75 kg.

(Futter: Reis 200 g, trockner Fisch 80 g, Gemüse 80 g,  
Sojasuppe 20 cem, Wasser 800 cem.)

Datum	Gallen-menge cem	Ammoniak		Bemerkungen
		mg	mg %	
22/ I	33	0,935	2,833	
23/ ,	30	0,850	2,833	
24/ ,	27	0,765	2,815	
25/ ,	31	0,808	2,606	
26/ ,	30	0,893	2,977	← Nucleinsäure 15 g
27/ ,	30	0,935	3,117	
28/ ,	30	0,935	3,117	
29/ ,	26	0,765	2,942	
30/ ,	40	1,190	2,975	← Nucleinsäure 15 g Cholsäure 0,375 g
31/ ,	28	1,020	3,643	
1/II	25	0,935	3,740	
2/ ,	23	0,808	3,478	
3/ ,	26	0,850	3,268	

(Vergleiche diese Tabellen mit I u II).

Der prozentuale Ammoniakgehalt der Galle bei Zufuhr von Hefenucleinsäure mit Cholsäure wird, verglichen mit dem durchschnittlichen Wert der Vorperiode in 2 Fällen um 5,3–19,4% vermehrt, aber in einem Fall um 2,7% vermindert, und im Vergleich mit dem der Nachperiode in einem Fall um 30,8% vermehrt, aber in 2 Fällen um 0,4–15,8% vermindert. Diese prozentual verminderte Ammoniakausscheidung beruht wohl auf der Verdünnung der Galle, da die Gallensekretion durch Mitzufuhr von Cholsäure stark gesteigert wird, wie in den Tabellen III–V angegeben ist.

Die Ammoniakausscheidung in der Galle wird also durch Zufuhr von Cholsäure und Nucleinsäure stärker vermehrt als durch die von Cholsäure allein.

TABELLE V.

Hund Nr. 5, Körpergewicht 11,5 kg.

(Futter: Reis 200 g, trockner Fisch 80 g, Gemüse 80 g,  
Sajasuppe 20 ccm, Wasser 800 ccm)

Datum	Gallenmenge: ccm	Ammoniak		Bemerkungen
		mg	mg%	
24/ I	42	0,510	1,214	
25/ „	45	0,510	1,133	
26/ „	40	0,468	1,170	
27/ „	37	0,425	1,148	
28/ „	52	0,533	1,058	← Nucleinsäure 23 g
29/ „	42	0,468	1,114	
30/ „	43	0,510	1,193	
31/ „	39	0,468	1,200	
1/II	40	0,510	1,275	
2/ „	63	0,925	1,428	← Nucleinsäure 23 g Cholsäure 0,575 g
3/ „	37	0,425	1,149	
4/ „	41	0,425	1,037	
5/ „	43	0,468	1,089	

Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass die vermehrte Ammoniakausscheidung in der Galle bei Zufuhr von Cholsäure wohl durch die den Nucleinstoffwechsel fördernde Wirkung der Cholsäure bedingt ist.

## ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Ammoniakausscheidung in der Galle wird durch perorale Zufuhr von Cholsäure vermehrt. Diese Vermehrung wird durch Mitzufuhr von Hefenucleinsäure weiter verstärkt.
2. Die Choleretische Wirkung der Cholsäure wird durch Hefenucleinsäure weiter verstärkt.

## LITERATUREN.

- Itoo, T. (1930): Arb. a. d. med. Univ. Okayama, **2**, 103.  
Itoo, T. (1932): Bioch. Zschr., **254**, 50.  
Karasawa, R. (1926): Jl. of Bioch., **6**, 139.  
Krüger, M. u. Reich, O. (1903): Zschr. Physiol. Chem., **39**, 165.  
Okamura, Takeji (1930): Arb. a. d. med. Univ. Okayama, **2**, 245.

# DER EINFLUSS DER GALLENSAURE AUF DIE SALZAUSSCHEIDUNG IN DER LEBERGALLE. V.

## Über die Alkalienausscheidung in der Galle.

VON

YUTAKA KAWADA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

Zwischen der Wirkung der vegetativen Nerven und der Elektrolyte soll nach Zondek (1929) eine so innige Beziehung bestehen, dass die Wirkung der Nerven durch die des Elektrolyten ersetzt werden kann. In obigem Sinne muss unter Einfluss eines vegetativen Nervengiftes eine Verteilungsänderung der Elektrolyte in den Organen und Geweben entsprechend der Nervenfunktion oder eine Mobilisierung der Elektrolyte aus den Organen stattfinden, deren Folge nicht nur im Harn und Blut, sondern auch in der Galle wahrzunehmen ist.

So haben Sekitoo (1929) und ich (1931) bei Zufuhr von Gallensäure eine Vermehrung des Calciums im Harn u. im Blut des Kaninchens und in der Galle des Hundes beobachtet. Die Gallensäure wirkt nach Sekitoo (1930) u. Tsuji (1930) auf den Sympathicus lähmend und auf den Vagus reizend. Dementsprechend hat Itoo (1930/32) experimentell beim Hunde beobachtet, dass die Alkalireserve der Lebergalle durch Zufuhr von Cholsäure vermehrt und der PH der Galle dadurch erhöht wird, was mit der Funktion der vegetativen Nerven eng verknüpft ist, indem durch Splanchnikotomie der PH und die Alkalireserve erhöht werden.

Um einerseits das Wesen der alkalischen Reaktion der Galle klarzustellen und andererseits den Zusammenhang zwischen der Wirkung der Gallensäure auf die vegetativen Nerven und der Salzausscheidung in der Galle zu erkennen, habe ich die Aus-

scheidung des Natriums und Kaliums aus der Lebergalle unter Einfluss von vegetativen Nervengiften untersucht.

Was die Salzausscheidung in der Lebergalle betrifft, so wurde von Ohta (1927), Usuki (1929) u. Maruno (1931) beobachtet, dass die Alkalienausscheidung in der Lebergalle durch parasympathische Reize gefördert wird.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden kräftige Hunde verwendet, denen eine permanente Gallenblasenfistel nach Bickel (1929) angelegt und eine Blasenkanüle mit Glaskugel Ikoma (1927) eingenäht wurde. Vor dem Versuch und während des Versuches wurde den Hunden immer eine bestimmte Nahrung täglich 2mal, mittags und um 6 Uhr abends, verabreicht.

Die Galle wurde 6 Stunden lang (von 6 Uhr morgens bis Mittag) wie üblich in eine Glaskugel gesammelt.

Ausserhalb der Sammlungszeit der Galle liess man beim Versuch die Hunde ihre eigene Galle ruhig ablecken. Der Versuch wurde in drei Perioden: Vor-, Nach- u. Versuchsperiode geteilt; in der Versuchsperiode wurde den Hunden eine gewisse Menge von Atropinlösung subcutan oder eine gewisse Menge von Cholsäure per os verabreicht. Für die Bestimmung des Natriums und Kaliums wurden 10 ccm Galle auf trocknem Weg verascht; die Asche wurde in 25 ccm einer einzehntel Normallösung von Salzsäure aufgenommen und von dieser Lösung wurden die Alkalien nach Kramer u. Tisdall (1921) bestimmt.

##### *I. Bei Zufuhr von Cholsäure oder Atropin.*

Bei diesem Versuch wurden in der Versuchsperiode dem Hunde 0,2 ccm einer 0,1%igen Atropinsulfatlösung pro Kilo subcutan oder 0,05 g Cholsäure pro Kilo per os verabreicht, um den Einfluss des Atropins und der Cholsäure auf die Ausscheidung des Natriums und des Kaliums in der Galle zu beobachten.

Aus den Tabellen I-IV lässt sich ersehen, dass die Gallensekretion bei Zufuhr von Atropin im Vergleich zu der in der Vorperiode um 10,3-29,8%, und verglichen mit der in der Nach-

TABELLE I.

Hund Nr. 1, 6 kg.

Nahrung: Reis 150 g, trockner Fisch 60 g, Gemüse 60 g,  
Sojasuppe 15 ccm, Wasser 600 ccm.

Datum	Gallenmenge ccm	Reaktion	Spez. Gew.	Natrium		Kalium		Bemerkungen
				mg	mg%	mg	mg%	
11/IV	31	Alkalisch	1019	121,9	393,2	6,8	21,8	
12/ „	29	„	1019	117,3	404,5	6,4	22,0	
13/ „	28	„	1018	109,5	391,0	6,1	21,6	
14/ „	28	„	1019	113,9	406,8	6,2	22,0	
15/ „	26	„	1018	96,4	370,6	5,3	20,3	← Atropin
16/ „	32	„	1018	122,9	384,2	6,6	20,5	
17/ „	30	„	1018	114,6	381,9	6,2	20,7	
18/ „	27	„	1018	105,6	391,0	5,7	21,2	
19/ „	32	..	1019	132,4	413,6	7,4	23,0	← Cholsäure
20/ „	27	„	1018	103,7	384,2	5,7	21,1	
21/ „	25	„	1019	99,5	397,8	5,6	22,5	
22/ „	28	..	1018	108,8	388,7	6,1	21,6	

periode um 12,9–17,9% herabgesetzt wird, während sie bei Zufuhr von Cholsäure im Vergleich zu der in der Vorperiode um 6,7–28,6%, und verglichen mit der in der Nachperiode um 18,5–26,3% gesteigert wird.

Die Gallensekretion aus der Leber wird also durch Cholsäure gesteigert, während sie durch Atropin gehemmt wird.

Der absolute Gehalt an Natrium in der Galle wird bei Zufuhr von Cholsäure im Vergleich zu dem in der Vorperiode um 15,8–34,8%, und verglichen mit dem in der Nachperiode um 27,3–31,8% vermehrt, und der prozentuale Gehalt wird gegenüber dem der Vorperiode um 5,4–7,2% und gegenüber dem der Nachperiode um 4,8–5,9% vermehrt, wie aus den Tabellen I-II erheilt.

Der absolute Kaliumgehalt der Galle wird bei Zufuhr von Atropin, verglichen mit dem der Vorperiode um 13,3–31,0%, und verglichen mit dem der Nachperiode um 14,1–20,6% vermindert,

TABELLE II.

Hund Nr. 2, 12 kg.

Nahrung: Reis 200 g, trockner Fisch 80 g, Gemüse 80 g,  
Soyasuppe 20 cem, Wasser 800 cem.

Datum	Gallenmenge cem	Reaktion	Spez. Gew.	Natrium		Kalium		Bemerkungen
				mg	mg%	mg	mg%	
11/IV	55	Alkalisch	1020	226,2	411,3	12,6	22,9	
12/ „	54	„	1019	213,6	395,5	12,2	22,5	
13/ „	57	„	1019	221,6	388,7	12,4	21,8	
14/ „	59	„	1019	230,2	391,0	13,0	22,1	
15/ „	47	„	1019	178,5	379,7	10,5	22,3	← Atropin
16/ „	59	„	1019	226,7	384,2	13,0	22,0	
17/ „	56	„	1019	216,4	386,5	12,5	22,3	
18/ „	54	„	1019	212,3	393,2	12,2	22,5	
19/ „	72	„	1020	294,6	409,1	17,0	23,6	← Cholsäure
20/ „	62	„	1019	242,4	391,0	13,5	21,8	
21/ „	57	„	1019	225,4	395,5	12,9	22,7	
22/ „	58	„	1019	225,5	388,7	12,8	22,0	
23/ „	52	„	1019	201,0	386,5	11,3	21,8	

und der prozentuale Gehalt wird gegenüber dem der Vorperiode um 1,2–6,5% und gegenüber dem der Nachperiode um 1,4–3,9% vermindert, wie sich aus den Tabellen I–IV ersehen lässt.

Das Natrium in der Galle wird also sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual durch Zufuhr von Cholsäure vermehrt, dagegen durch eine solche von Atropin vermindert.

Der absoluten Menge nach wird die Kaliumausscheidung in der Galle bei Zufuhr von Cholsäure, verglichen mit der in der Vorperiode, um 19,4–34,9%, verglichen mit der in der Nachperiode, um 27,3–34,9% gesteigert und prozentual, verglichen mit der in der Vorperiode, um 5,9–10,6%, verglichen mit der in der Nachperiode, um 6,0–6,8% vermehrt, wie in den Tabellen I–II angegeben ist.

Bei Zufuhr von Atropin wird sie der absoluten Menge nach

gegenüber der in der Vorperiode um 13,3–30,2%, gegenüber der in der Nachperiode um 14,5–21,1% herabgesetzt und prozentual, verglichen mit der in der Vorperiode, um 1,4–7,1%, verglichen mit der in der Nachperiode, um 0,7–6,8% vermindert.

Die Kaliumausscheidung in der Galle wird also ebenfalls sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual durch Zufuhr von Cholsäure vermehrt, dagegen durch eine solche von Atropin herabgesetzt.

Das Natrium sowie das Kalium in der Lebergalle wurden durch perorale Zufuhr von Cholsäure deutlich vermehrt, dagegen durch subeutane Zufuhr von Atropin vermindert.

Die Gallensekretion aus der Leber und die Ausscheidung des Kaliums sowie des Natriums in der Lebergalle hängen also von dem Tonus der vagischen Nerven ab, deren Erregung eine

TABELLE III.

Hund Nr. 1, 6 kg.

Nahrung: Reis 150 g, trockner Fisch 60 g, Gemüse 60 g,  
Sojasuppe 15 ccm, Wasser 600 ccm.

Datum	Gallen-menge ccm	Reaktion	Spez. Gew.	Natrium		Kalium		Bemerkungen
				mg	mg %	mg	mg %	
18/III	30	Alkalisch	1019	115,3	384,2	6,3	21,1	
19/ „	27	„	1018	102,5	379,7	5,6	20,9	
20/ „	28	„	1018	103,8	370,6	5,7	20,5	
21/ „	29	„	1019	114,0	393,2	6,3	21,8	
22/ „	25	„	1018	94,4	377,4	5,2	20,9	← Atropin
23/ „	27	„	1019	103,7	384,2	5,8	21,4	
24/ „	29	„	1019	112,1	386,5	6,3	21,6	
25/ „	30	„	1018	113,9	379,7	6,7	21,2	
26/ „	29	„	1018	112,1	386,5	6,2	21,4	← Atropin u. Cholsäure
27/ „	28	„	1019	110,1	393,2	6,1	21,8	
28/ „	26	„	1019	103,4	397,8	5,8	22,5	
29/ „	29	„	1018	110,8	381,9	6,0	20,7	
30/ „	27	„	1019	103,7	384,2	5,7	21,1	

vermehrte Sekretion der Lebergalle und eine vermehrte Ausscheidung des Kaliums sowie des Natriums zur Folge hat.

Diese Daten stimmen mit der von Itoo (1932) angegebenen Tatsache überein, dass die Alkalireserve und der PH der Lebergalle durch Zufuhr von Cholsäure erhöht werden, was letzteres eine stärkere alkalische Reaktion der Galle zur Folge hat, die für die Verdauung im Darm gute Dienste leisten sollte.

## *II. Bei Zufuhr von Atropin mit Cholsäure.*

Diesmal wurden eine Stunde nach der peroralen Zufuhr von 0,05 g Cholsäure pro Kilo 0,2 cem einer 0,1%igen Atropinsulfatlösung pro Kilo subcutan verabreicht, um den Einfluss von beiden

TABELLE IV.

Hund Nr. 2, 12 kg

Nahrung: Reis 200 g, trockner Fisch 80 g, Gemüse 80 g,  
Sojasuppe 20 cem, Wasser 800 cem.

Datum	Gallenmenge ccm	Reaktion	Spez. Gew.	Natrium		Kalium		Bemerkungen
				mg	mg%	mg	mg%	
20/III	65	Alkalisch	1019	257,1	395,5	14,5	22,3	
21/ „	68	„	1019	272,0	400,0	15,6	22,9	
22/ „	67	„	1019	257,2	386,5	14,6	21,8	
23/ „	62	„	1019	243,8	393,2	13,8	22,3	
24/ „	46	„	1018	177,8	386,5	10,1	22,0	← Atropin
25/ „	55	„	1019	217,5	395,5	12,4	22,5	
26/ „	57	„	1019	224,1	393,2	12,9	22,7	
27/ „	57	„	1020	234,4	411,3	13,1	23,0	
28/ „	56	„	1019	219,0	391,0	12,4	22,1	
29/ „	52	„	1020	218,6	420,4	12,5	24,1	← Atropin u. Cholsäure
30/ „	53	„	1020	225,2	424,9	13,0	24,5	
31/ „	57	„	1020	237,0	415,8	13,5	23,7	
1/IV	56	„	1019	217,7	388,7	12,2	21,8	
2/ „	54	„	1019	211,1	391,0	11,9	22,0	

zusammen auf die Ausscheidung des Kaliums und Natriums in der Galle festzustellen.

Aus den Tabellen III u. IV ist ersichtlich, dass der Natriumgehalt der Galle bei Zufuhr von Atropin mit Cholsäure der absoluten Menge nach, verglichen mit dem in der Vorperiode einmal um 2% vermehrt, ein anderes Mal um 2,3% vermindert, und gegenüber dem der Nachperiode einmal um 3,7% vermehrt, ein anderes Mal um 1,9% vermindert wird, während er prozentual, verglichen mit dem der Vor- sowie Nachperiode, um 1,0–5,8% vermehrt wird.

Der Kaliumgehalt der Galle wird bei Zufuhr von Atropin mit Cholsäure, verglichen mit dem der Vor- sowie Nachperiode, sowohl der absoluten Menge nach als auch prozentual entweder ganz wenig vermehrt oder vermindert, was auch bei der Gallensekretion der Fall ist, wie aus den Tabellen III u. IV ersichtlich ist.

Aus dem Ergebnis geht hervor, dass die Wirkungen von Atropin und Cholsäure bei der Gallensekretion sowie bei der Ausscheidung des Kaliums und Natriums in der Galle ausgeglichen werden, da sie gegeneinander antagonistisch wirken.

Aus den obigen Daten kann wohl der Schluss gezogen werden, dass die Cholsäure auf den Vagus reizend wirkt, indem sie die Gallensekretion aus der Lebergalle vermehrt, was mit den Ergebnissen von (Sekitoo 1930, Tsuji 1930, Ohta 1927 u. Maruno 1931) ganz übereinstimmt.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Kalium- sowie Natriumausscheidung in der Lebergalle wird durch Cholsäure gesteigert, durch Atropin dagegen herabgesetzt.

2. Die Gallensekretion aus der Leber wird durch Cholsäure vermehrt, während sie durch Atropin herabgesetzt wird. Auf Grund der Daten scheint mir die Cholsäure auf den Vagus reizend zu wirken.

## LITERATUR.

- Bickel, A. (1912): Chirur. Tech. d. norm. u. path. Physiol., s. 36.  
Ikoma, S. (1927): Okayama Igakkai Zasshi, 40 Jg. 2476.  
Itoo, T. (1930): Arb. aus d. Med. Univ. Okayama, 2, 103.  
Itoo, T. (1932): Bioch. Zsch., 254, 50.  
Kawada, Y. (1931): Jl. of Bioch., 13, 133.  
Kramer, B. and Tisdall, F. F. (1921): Jl. of Biolog. Chem., 48, 223.  
Maruno, T. (1931): Jl. of Gastroenterol., 6, 996.  
Ohta, R. (1927): Jl. of Gastroenterol., 2, 1273.  
Sekito, T. (1929): Jl. of Bioch., 11, 251 u. 391.  
Sekito, Y. (1930): Jl. of Bioch., 12, 59.  
Tsuji, K. (1930): Jl. of Bioch., 12, 139.  
Usuki, T. (1929): Jl. of Gastroenterol., 4, 1006.  
Zondek, S. G. (1929): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 143, 192.

## BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLE-HYDRATSTOFFWECHSEL. XXXI.

### Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Hypophysen-extrakt und Cholsäure.

VON

KANAME OHASHI.

(*Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama,  
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 21. Februar 1934)

Ausser der morphogenetischen, sexuellen, hormonregulierenden Funktion besitzt der drüsige Teil der Hypophyse wichtige Stoffwechselwirkungen und steht mit dem Eiweiss-, Fett-, Kohlehydrat-, Wasser- und Mineralstoffwechsel in innigem Zusammenhang.

Was die Hypophysenwirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel anbetrifft, so wurden über sie von vielen Autoren (wie Aschner 1912; Aschner u. Porges 1912; Cushing u. Davidoff 1927; Houssay u. Biasotti 1930, 31; Houssay 1932 usw.) genaue Untersuchungen angestellt. Es wurde gefunden, dass die Hypophysektomierten viel leichter hypoglykämisch werden und weniger leicht auf hyperglykämierende glykosurierende Faktoren reagieren, als es bei Zufuhr der Hinterlappenauszüge beim Kaninchen der Fall war, was von Boe (1914) und Gigon (1926) bewiesen wurde, und dass diese Unterschiede während des Hungers sich verstärken. Weiter besitzen Hypophysektomierte eine bessere Toleranz für Zucker.

Nach den genannten Autoren scheinen die hypophysektomierten Tiere weniger Zucker, speziell während des Hungers, auf Kosten des endogenen Eiweisses zu bilden.

Die Hypophyse scheint also normalerweise die Zuckerbildung speziell auf Kosten der endogenen Eiweisskörper zu fördern und ihre Wirkung kann auf die Leber oder auf Gewebe im allgemeinen gerichtet sein, was ich hier näher untersuchen möchte.

Nach Achard u. Desbouis (1913) u. Heymans u. Pupco (1926) wird die alimentäre Glykämie u. Glykosurie durch Zufuhr von Hypophysenextrakt gesteigert, und nach Moehlig u. Ainslee (1925) u. Winter u. Smith (1924) soll die antagonistische Wirkung der Hinterlappenauszüge auf die Insulinhypoglykämie an das Vorhandensein von Leberglykogen gebunden sein.

Hinsichtlich des Einflusses der Hypophysenhinterlappenzufuhr auf den Glykogengehalt der Leber gehen die Angaben auseinander, da Fukui (1925) eine Änderung vermisste und nach Nitzescu u. seinen Mitarbeitern (1927/28) der Glykogenbestand der Leber ansteigt, das Muskelglykogen dagegen mobilisiert wird. Also scheint es sich mir bei der Hypophysenwirkung nicht um einen Mangel der Zuckerfixation in der Leber als Glykogen, sondern um eine Hemmung der Glykogenolyse in der Leber und um eine Insuffizienz der Verbrennung in den Geweben zu handeln.

Der Hypophysenextrakt soll nach Pines (1925) über das Nervensystem auf den Zuckerstoffwechsel einwirken.

Was die Beziehung zwischen der Wirkung des Hypophysenextraktes und der Gallensäure betrifft, so wurde von Taku (1928) gefunden, dass das Pituitrin von Park Davis bei Kaninchen die hypoglykämische Wirkung der Cholsäure im allgemeinen nicht beeinflusst oder nur etwas hemmt, dass bei gleichzeitiger Zufuhr von Cholsäure u. Pituitrin der Blutzuckergehalt, verglichen mit dem bei Zufuhr von Cholsäure allein, später gesteigert wird.

Nach Autoren wie Komuro (1927) u. Taku (1928) wird der Blutzuckergehalt des Kaninchens durch Zufuhr von Pituitrin vorübergehend herabgesetzt. All dies scheint mir auf der mangelhaften Zuckerverbrennung und Glykogenolyse im Kaninchenorganismus zu beruhen.

Unter Berücksichtigung aller obigen Feststellungen habe ich die Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Hypophysenextrakt ohne oder mit Cholsäure untersucht, um das Wesen der Hypophysenwirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel klarzustellen und um andererseits die Beziehung zwischen der Wirkung des Hypophysenextraktes und der Gallensäure zu erkennen.

## EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden kräftige männliche Kaninchen, in zwei Gruppen geteilt, 4 Tage lang in Hunger gehalten; vorher waren alle Tiere eine Zeit lang mit einer bestimmten Nahrung gefüttert worden. Den Kaninchen der einen Gruppe wurden 0,2 ccm einer Pituitrinlösung von Park Davis pro Kilo subcutan und gleichzeitig 3 ccm einer 50%igen Traubenzuckerlösung pro Kilo intravenös verabreicht. Den Tieren der zweiten wurden ausserdem 3 ccm einer 1%igen Natriumcholatlösung pro Kilo subcutan verabreicht. 4 Stunden nach der Zuckerzufuhr wurden alle Kaninchen in der gleichen Weise durch Nackenschlag und Verblutung aus der Carotis getötet, und der Glykogengehalt der schnell herausgeholt und abgewogenen Leber wurde nach Iwasaki u. Moori (1926) u. Bertrand bestimmt.

*1. Bei Zufuhr von Traubenzucker mit Pituitrin.*

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass der Glykogengehalt der Leber durchschnittlich 2,195% beträgt. Nach Fuziwara (1932) soll der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Glukose allein unter gleichen Bedingungen 1,338% betragen.

Die Glykogenbildung der Leber aus Glukose wird also durch Zufuhr von Pituitrin um 64,05% gesteigert. Pituitrin, Hypophysenextrakt, hat also eine die Glykogenie aus Glukose in der Leber fördernde Wirkung.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Achard u. Desbouis (1913) und Heymans u. Pupco (1926) überein, dass bei der Hypophysenwirkung die Zuckerfixation in der Leber als Glykogen nicht mangelhaft ist.

*2. Bei Zufuhr von Traubenzucker mit Pituitrin  
u. Cholsäure.*

Aus der Tabelle II lässt sich ersehen, dass der Glykogengehalt der Leber bei Zufuhr von Glukose mit Pituitrin u. Cholsäure 3,20% beträgt. Die Glykogenbildung der Leber aus Glukose wird also durch Zufuhr von Pituitrin mit Cholsäure stark gesteigert, und zwar gegenüber der bei Zufuhr von Pituitrin allein um 45,8% und

TABELLE I.  
(beim Pituitrinversuch).

Datum	Nr. des Kanin-chens	Körpergewicht		Leber-gewicht: g	Leberglykogen	
		Vor dem Hunger: g	Nach dem Hunger: g		mg	%
18/III	1	2150	2010	45,4	1002,61	2,208
	2	1840	1610	33,2	706,26	2,127
	3	2510	2320	38,7	949,30	2,453
	4	2180	2070	27,5	501,16	1,822
22/III	5	1990	1720	38,0	940,91	2,476
	6	1860	1660	32,8	660,20	2,013
	7	1980	1800	35,3	876,02	2,482
	8	1960	1740	37,4	798,67	2,135
26/III	9	1810	1630	30,2	629,49	2,084
	10	1720	1580	41,5	892,24	2,150
Durchschnittswert					795,69	2,195

TABELLE II.  
(beim Pituitrin-Cholsäure-Versuch).

Datum	Nr. des Kanin-chens	Körpergewicht		Leber-gewicht: g	Leberglykogen	
		Vor dem Hunger: g	Nach dem Hunger: g		mg	%
20/III	1	2270	2150	39,6	1161,94	2,934
	2	2320	2100	40,9	1259,27	3,079
	3	2290	2050	32,8	1082,27	3,300
	4	2520	2300	41,3	1374,57	3,328
23/III	5	1970	1770	40,0	1409,39	3,523
	6	1870	1630	33,3	939,17	2,820
	7	2480	2300	42,0	1396,50	3,325
	8	1910	1750	38,0	1325,90	3,489
26/III	9	1790	1500	37,3	1194,38	8,212
	10	2010	1830	37,2	1114,14	2,995
Durchschnittswert					1225,75	3,200

verglichen mit der bei Zufuhr von Glukose allein nach Fuziwaru (1932) um 139,16%. Die die Glykogenie aus Glukose in der Leber fördernde Wirkung des Pituitrin wird also durch Zufuhr von Cholsäure weiter verstärkt. Für die Glykogenbildung aus Glukose in der Leber wirkt das Pituitrin mit Cholsäure nämlich synergistisch.

Die Hypophysenfunktion muss also mit der Gallensäurebildung in der Leber bzw. mit der Glykogenbildung in innigem Zusammenhang stehen.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Die Glykogenie aus Glukose in der Leber wird durch Pituitrin gefördert, und diese die Glykogenie aus Glukose fördernde Wirkung des Pituitrin wird durch Cholsäure weiter verstärkt.

#### LITERATUR.

- Acard, Ch. u. Desbouis, G. (1913): Soc. Biol., **74**, 467.
- Aschner, B. (1912): Pflüger's Arch., **146**, 1.
- Aschner, B. u. Porges, O. (1912): Bioch. Zschr., **39**, 200.
- Boe, G. (1914): Bioch. Zschr., **64**, 450.
- Cushing, H. u. Davidoff, L. M. (1927): Arch. int. Med., **39**, 673.
- Fukui, T. (1925): Pflüger's Arch., **210**, 427.
- Fuziwaru, K. (1932): Bioch. Zschr., **248**, 264.
- Gigon, A. (1926): Bioch. Zschr., **174**, 257.
- Heymans, C. u. Pupeo, H. (1926): Soc. Biol., **94**, 1253.
- Houssay, B. A. u. Biasotti, A. (1930): C. r. soc. Biol., **104**, 407.
- "          u.          "          (1931):          "          **105**, 121–126.
- "          u.          "          (1931):          "          **107**, 733.
- "          u.          "          (1931): Pflüger's Arch., **227**, 239, 657  
      u. 664.
- Houssay, B. A. (1932): Klin. Wschr., **11** Jg. 1529.
- Iwasaki, K. u. Moori, M. (1926): Praxis Physiol. Chem. Kursus nach Sudo, 11. Aufl. 334.
- Komuro, M. (1927): Folia Endocrinolog. Japonica, **3**, 658.
- Moehlig, R. C. u. Ainslee, H. B. (1925): Jl. amer. med. Assoc., **84**, 1389.
- Nitzesceu, J. J. u. Ramneantu, P. (1927): C. r. Soc. Biol., **97**, 1105.
- Nitzesceu, J. J. u. Benetato, M. (1928): C. r. Soc. Biol., **98**, 58.
- Pines, I. L. (1925): Zs. Neurol. Psych., **100**, 123.
- Taku, A. (1928): Jl. of Bioch., **9**, 299.
- Winter, L. B., u. Smith, W. (1924): Jl. of Physiol., **58**, 327.



## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PARTIELLEN ABBAU DES SEIDENFIBROINS.

VON

TOYOO UCHINO.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Tokyo.  
Vorstand: Prof. S. Kakiuchi.)

(Eingegangen am 24. Februar 1934.)

### EINLEITUNG.

Seitdem es E. Fischer nachzuweisen gelang, dass die Proteine im grossen und ganzen die Komplexe von säureamidartig verknüpften Aminosäuren sind, trat die Frage der Konstitution der Proteine in den Vordergrund des Interesses und seit dieser Zeit hat eine Anzahl von Chemikern und Physiologen sich mit dieser Frage von verschiedenen Seiten her beschäftigt. Man hat versucht, in die Struktur der Eiweisskörper dadurch Einblick zu gewinnen, dass man die Proteine durch verschiedene Methoden stufenweise hydrolysierte, um die partiellen Spaltungsprodukte von bestimmter Struktur daraus loszulösen und dadurch zu entscheiden, in welcher Art und Weise die einzelnen Aminosäuren im Molekül der ursprünglichen Proteine unter sich verbunden sind. Im folgenden sind die wichtigsten Arbeiten nach dieser Richtung hin kurz erwähnt.

Schon E. Fischer (1906) hat darauf aufmerksam gemacht, dass im Eiweiss neben der Peptidbindung noch andersartige Verkettungen, welche er recht wahrscheinlich als Piperazinringe annahm, eine Rolle spielen.

In den nachfolgenden Jahren haben E. Fischer, Abderhalden und ihre Mitarbeiter zur Spaltung von Eiweiss 70%ige Schwefelsäure, eventuell konzentrierte Salzsäure in der Kälte verwendet und konnten unter solchen Bedingungen neben verschiedenartigen Di-, Tri- und Tetrapeptiden eine Reihe von Aminosäure-anhydriden erhalten. Später machte Abderhalden (1923) auf

diese Resultate aufmerksam und behauptete mit zahlreichen Belegen die Meinung, dass im Eiweissmolekül neben den säureamidartig verknüpften Aminosäuren Diketopiperazinringe präformiert vorhanden seien.

Ssadikow und Zellinsky (1923, 1924) erhielten durch Behandlung von Proteinen mit verdünnten Mineralsäuren bei 180° unter Druck sehr hohe Ausbeuten an Anhydriden. Sie haben daraus die Schlussfolgerung gezogen, dass die Konstitution des Eiweissmoleküls keine polypeptidartige ist, wie es E. Fischer sich vorstellte, sondern es sich um ein System von Ringen handelt, unter welchem die Peptinringe (Diketopiperazine) eine dominierende Stellung einnehmen und durch lange Methylenketten zusammengehalten sind. Durch diese Annahme wollten sie sogar die Diketopiperazinringe an Stelle der Polypeptidketten E. Fischers setzen.

Shibata (1925) hat auch diese Anschauung vertreten. Er behandelte verschiedene Eiweissstoffe mit wasserfreiem Glycerin bei 180-190° und erhielt unter den Abbauprodukten eine Anzahl von (kristallinischen) Fraktionen, welche sämtlich auf Carbonylreaktion die Anwesenheit von Aminosäureannhydriden bewiesen. Umgekehrt hat er auch durch Hinzufügen eines kleinen Kriställchen Bariumoxyds auf synthetisch dargestellte Diketopiperazine, welche mit Glycerin auf 170° erhitzt und mit vielfacher Menge Alkohol versetzt wurden, kolloidale, eiweissähnliche Substanz erhalten. Er hatte diese Beobachtung direkt mit der damals herrschende Anschauung der Polysaccharidechemie in Einklang zu bringen versucht und die Meinung geäussert, dass die Diketopiperazine als Elementarkörper der Proteine und folglich die letzteren als die Nebenvalenzassoziationsprodukte der vorderen anzusehen seien.

In allen hier dargelegten Versuchen wurden zwar durch partielle Spaltung von Eiweisskörpern Aminosäureanhydride erhalten; es scheint hiermit jedoch kein sicherer Beweiss vorhanden zu sein, dass alle die nachgewiesenen Anhydridkomplexe primär im Eiweissmolekül vorgebildet waren, da in diesen Fällen stets nur die Abbauendprodukte und überdies die leicht zu charakterisierenden

kleinen Anteile derselben untersucht wurden. Die Autoren haben die Möglichkeit der sekundären Veränderungen der Bindungsweise der Aminosäuren im Verlaufe ihrer Spaltungsvorgänge ganz ausser Acht gelassen. Es wurde schon von vielen Seiten festgestellt, dass die Anhydride sehr wohl aus ursprünglich vorhandenen Polypeptiden, eventuell Aminosäuren sekundär entstandene Kunstprodukte sein können. Z. B. hat Brigl (1923) zuerst Glycylglycin der katalytischen Spaltung nach der Methode von Ssadikow und Zellinsky unterworfen, wobei sich neben Glykokollbildung eine reichliche, mindestens 40%ige Ausbeute an Diketopiperazin beobachteten liess. Abderhalden und Komm (1924) haben dann nachgewiesen, dass verschiedene Di-, Tri- und Tetrapeptide beim Erhitzen mit Wasser oder verdünnten Mineralsäuren in Anhydride übergehen. Abderhalden und Schwab (1925) haben ferner beobachtet, dass beim Erhitzen von Di- und Tripeptiden im Glycerin ganz glatt Diketopiperazine entstehen.

Es gelangen andererseits Herzog, Brill u. a. (Herzog und Janke, 1920; Brill, 1923; Herzog und Kobel, 1924; Herzog, 1924) auf Grund der Untersuchung der Röntgenspektren nachzuweisen, dass das Diagramm der Seide mit dem des Glycyl-d-alaninanhydrids sehr ähnlich ist. Durch diesen Befund Herzogs ist es möglich geworden, dass im Eiweissmolekül neben den Peptidketten auch anhydridartig abgeschlossene Ringsysteme von Aminosäuren präformiert enthalten sind.

In der vorliegenden Untersuchung habe ich mir, einer Anregung von Herrn Prof. Kakiuchi folgend, die Aufgabe gestellt, den Eiweisskörper durch geeignete Methoden und zwar unter verschiedenen Versuchsbedingungen stufenweise aufzuspalten. Die dabei entstehenden Abbauprodukte wurden in einer Reihe von Fraktionen getrennt und die letzteren in bezug auf ihre chemische Zusammensetzung miteinander verglichen und dadurch Einblick in die Konstitution der Proteine zu gewinnen versucht. Dabei ist es durchaus erforderlich alle entstehenden Abbauprodukte zu analysieren, und zugleich die mit dem Fortschritt der Spaltung stattfindenden Veränderungen der Bindungsart der Aminosäuren zu verfolgen. Dadurch kann man die Frage, ob dabei tatsächlich

sekundäre Bildung von Anhydriden stattfindet. entscheiden.

Nach E. Fischer und Skita (1901, 1902) besteht das Fibroin der Seide zu weit mehr als der Hälfte aus Glykokoll und Alanin, und enthält auch ca 10 Proz. Tyrosin. Alle übrige Aminosäuren treten dagegen stark zurück und machen nur einen kleinen Bruchteil des Fibroinmoleküls aus. Infolge beschränkter Zahl der Bausteine scheint das Fibroin ganz eigenartig einfache Struktur zu besitzen und deshalb ist es von jeher am häufigsten Gegenstand der Untersuchungen gewesen, die zur Erläuterung der Konstitution der Proteine ausgeführt wurden. So ist es gelungen, aus dem Seidenfibroin beim partiellen Abbau immer nur verhältnismässig einfache, leicht zu charakterisierende Produkte zu gewinnen. Ich habe daher in meiner Untersuchung dieses Eiweiss als Versuchsmaterial verwendet.

### I. DARSTELLUNG DES SEIDENFIBROINS.

Zur Darstellung des Seidenfibroins wurde das von Cramer zuerst angegebene, von E. Fischer und Skita (1901) modifizierte Verfahren benutzt.

Die von den Puppen sorgfältig befreiten und 24 Stunden lang mit Wasser abgespülten Cocons wurden in einem 5 Liter fassenden Porzellangefäss mit der 25-fachen Menge Wasser drei Stunden im Autoklaven auf 117–120° erhitzt. Diese Operation wurde mehrmals wiederholt, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfand. Bei quantitativen Proben wurde festgestellt, dass ein dreimaliges Kochen mit Wasser völlig genügte, um die Gewichtskonstanz zu erzielen, und die Menge des dabei zurückgebliebenen Fibroins 72 bis 75 Proz. der angewandten Cocons entsprach.

Das Fibroin wurde zur weiteren Reinigung 24 Stunden in 1%iger Salzsäure eingeweicht, mit Wasser vollständig frei von Serizin und Salzsäure gewaschen, mit Alkohol und Äther entwässert.

Das durch dieses Verfahren erhaltene, lufttrockene Seidenfibroin enthielt 16.63–17.62 Proz. Stickstoff (nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt).

## II. SPALTUNG DES SEIDENFIBROINS DURCH GLYCERIN.

Wie schon oben erwähnt, hat Shibata (1925) Versuche unternommen, die Proteine durch Erhitzen in Glycerin in ihre Elementarkörper zu depolymerisieren, und konnte eine Reihe von kristallinischen Fraktionen gewinnen, welche gegen Carbonylreagentien nach Sasaki (1921) positiv reagierten und sich als Diketopiperazine erwiesen. Die Belege für die chemische Kennzeichnung einzelner Fraktionen fehlen aber in seiner vorläufigen Mitteilung.

In der vorliegenden Untersuchung, welche es zum Ziele hat aus Seidenfibroin partielle Spaltungsprodukte zu isolieren, wurde zuerst der Versuch von Shibata nachgeprüft.

Shibata behandelte verschiedene Eiweissarten mit Glycerin ungefähr 10 Stunden lang bei 180–190°. Die erhaltene Glycerinlösung wurde, erst mit Äther, dann mit Chloroform ausgezogen, mit Wasser versetzt und in einem Steinmörser längere Zeit gerieben. Der abgeschiedene Niederschlag wurde abgenutscht, getrocknet und mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln wie Essigäther, Aceton, Äthylalkohol, Methylalkohol, Eisessig und kochendem Wasser nacheinander extrahiert. Bei meiner Nachprüfung liess sich aber auf diese Weise keine gute Ausbeute an kristallinischen Substanzen erzielen. Immer störend auf das Abscheiden der Kristalle wirkte das Glycerin ein. Um diese Unbequemlichkeit zu umgehen und die weiteren Aufarbeitungen zu erleichtern, wurde das Glycerin im Vakuum von 10 mm Hg bei 162–164° abdestilliert und der möglichst von Glycerin befreite Rückstand unter Anwendung von organischen Lösungsmitteln in verschiedene Fraktionen getrennt. Auf diese Weise war es mir gelungen, aus der in Essigäther löslichen Fraktion Anhydrid des Glykokolls und Alanins zu gewinnen.

Das sorgfältig getrocknete Seidenfibroin (200 g) wurde in einem Rundkolben mit der zehnfachen Menge wasserfreiem Glycerin, welches sich durch Erhitzen des käuflichen Glycerins auf etwa 180° erhalten liess, 20–25 Stunden lang im Ölbad auf 180–190° erhitzt. Ab und zu wurde der Kolbeninhalt mit dem Glasstab gut umgerührt. Allmählich ging das Fibroin in Lösung über unter

Braunfärbung und mit zunehmender Fluoreszenz der Glycerinlösung. Da jedoch keine vollständige Lösung eintrat, wurde die schwarzbraun gefärbte Glycerinlösung noch heiß abgesaugt und von der beträchtlichen Menge ungelösten Fibroins getrennt. Die Glycerinlösung wurde im Vakuum von 10 mm Hg abdestilliert und möglichst vollständig von Glycerin befreit. Der schwarzbraune zähe Rückstand wurde noch heiß ausgegossen, mit Kaolin gut vermischt und im Soxhlet-Apparat nacheinander mit Essigäther, Alkohol, Methylalkohol usw. extrahiert.

Aus dem Essigätherextrakt schied sich nach dem Verjagen des Lösungsmittels eine reichliche Menge von gelblichen Körnchen aus, welche in braunem, harzigem Sirup eingebettet sind. In diesen Körnchen waren unter dem Mikroskop zu kugeligen Aggregaten vereinnigte Nadeln zu erkennen. Zur Trennung dieser Substanz von dem Sirup fügte man eine kleine Menge Methylalkohol hinzu, dann wurde sofort abgenutscht und mit kaltem Methylalkohol gut gewaschen. Dieses Produkt, das in rohem Zustande ca. 5 g wog, wurde zur weiteren Reinigung zweimal aus Methyl- und schliesslich aus Äthylalkohol unter Zusatz von etwas Tierkohle umkristallisiert. Es kristallisierten aus dem Alkohol farblose schöne Nadeln. Diese Substanz war leicht löslich in Wasser und zeigte keine Millonsche Reaktion. Auch die Biuretreaktion fiel negativ aus. Sie gab aber starke Pikrinsäurereaktion und schmolz bei 239° unter Zersetzung. Der Aminostickstoff und die freie Carboxylgruppe waren nicht nachweisbar. Für die Analyse wurde sie 3 Stunden im Vakuum bei 110° getrocknet.

0.0632 g Substanz gaben 0.1080 g CO<sub>2</sub> und 0.0341 g H<sub>2</sub>O.

Für C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ber.	Gef.
C 46.86%	C 46.60%	
H 6.30%	H 6.04%	
N 21.84%	N 22.07%	

(Nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt).

Die Bestimmung des Molkulargewichtes ergab 114.8. Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Glycin-alaninanhydrid) : 128.1.

Das Ergebnis der Analyse beweist, dass ein Anhydrid des Glykokolls und Alanins vorliegt.

Die äthyl- sowie methylalkoholischen Auszüge waren stark gefärbt und gaben recht starke Millonsche Reaktion. Beim Abdampfen des Lösungsmittels hinterliessen sie aber schwarze Schmieren, und die weitere Isolierung derselben schlug gänzlich fehl.

Durch Chloroform, Aceton und Äther liess sich keine bedeutende Menge von Substanzen ausziehen.

Die Abbauprodukte, welche Tyrosin als Baustein enthalten, liessen sich hier nicht isolieren. Dies röhrt wohl daher, dass das Tyrosin bei der Behandlung mit Glycerin sich in dunkelgefärbte, melaninartige Körper verwandelte.

Durch dieses Verfahren konnte man also wohl ein Diketopiperazin, welches aus Glykokoll und Alanin besteht, aber nicht ein solches, an dessen Aufbau Tyrosin beteiligt ist, isolieren. Ich habe mich daher zur Spaltung des Seidenfibroins einem anderen Verfahren zugewandt.

### III. SPALTUNG DES SEIDENFIBROINS MITTELS KONZENTRIERTER SCHWEFELSÄURE UNTER KÄLTEANWENDUNG.

E. Fischer, Abderhalden und ihre Mitarbeiter haben zur teilweisen Hydrolyse von Eiweisskörpern 70%ige Schwefelsäure sowie konzentrierte Salzsäure bei niederer Temperatur verwendet. Dabei wurden auch verschiedene Diketopiperazine neben einer Reihe von Di-, Tri- und Tetrapeptiden erhalten. Es wurden bis jetzt aus Seidenfibrin auf derartigen Wegen die folgenden Produkte isoliert.

*d*-Alanyl-glycin (Abderhalden 1909, 1910, 1911)

Glycyl-*d*-alanin (Fischer und Abderhalden, 1907)

Anhydrid des Glykokolls und *d*-Alanins (Fischer und Abderhalden, 1906; Abderhalden, 1923; Adberhalden und Schwab, 1924)

Glycyl-*l*-tyrosin (Abderhalden, 1909, 1911; Abderhalden und Inoue, 1912)

Anhydrid des Glykokolls und *l*-Tyrosins (Fischer und Abderhalden, 1906; Abderhalden und Schwab, 1924)

*d*-Alaninanhydrid (Abderhalden und Suwa, 1910)

Anhydrid des *d*-Alanins und *l*-Serins (Fischer und Abder-

halde, 1907; Abderhalden und Schwab, 1924)

*d*-Alanyl-glycyl-*l*-tyrosin (Abderhalden, 1911)

Tetrapeptid, bestehend aus 2 Molekülen Glykokoll, 1 Molekül Alanin und 1 Molekül Tyrosin (Fischer und Abderhalden, 1907; Abderhalden und Schwab, 1924)

Da die konzentrierte Schwefelsäure stärkere wasserentziehende Wirkung als die 70%ige ausübt, darf man wohl mit Recht erwarten, dass der partielle Abbau der Eiweisskörper mit der konzentrierten Säure bessere Ausbeute an Anhydriden liefern wird. Die folgenden Hydrolysenversuche des Seidenfibroins wurden daher mittels konzentrierter Schwefelsäure vorgenommen und da die letztere bei höherer Temperatur verkohlende Wirkung entfaltet, wurde die Aufspaltung unter Kälteanwendung, d. h. bei  $-10^{\circ}$ ,  $0^{\circ}$  oder bei Eisschranktemperatur herbeigeführt.

10–50 g Fibroin wurden in der fünf- bis zehnfachen Menge konzentrierter Schwefelsäure, welche vorher mit Kältemischung oder Eiswasser gut abgekühlt war, gelöst und bei  $-10^{\circ}$ ,  $0^{\circ}$  oder im Eisschrank bei der Temperatur von  $7\text{--}8^{\circ}$  aufbewahrt. Nach mehrstündigem oder mehrtägigem Stehen wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt, die Säure mit Baryt quantitativ ausgefällt und abfiltriert. Der Bariumsulfatniederschlag wurde dann mehrmals mit kochendem Wasser digeriert, bis das Waschwasser sehr schwache Millonsche Reaktion zeigte. Das Filtrat und die Waschungen wurden vereinigt und unter verminderter Druck bei einer Temperatur unter  $40^{\circ}$  bis zur Trockenheit verdampft. Die Menge des Rückstandes war aber sehr gering und machte jedenfalls nur 30–40 Proz. des verwendeten Materials aus. Das Produkt zeigte Millonsche und Pikrinsäurereaktion. Auch die Biuretreaktion fiel positiv aus und die bei  $-10^{\circ}$  kurze Zeit der Spaltung ausgesetzten Produkte zeigten die Hopkins-Colesche Reaktion. Zur Isolierung der einzelnen Fraktion wurde es mit Kieselgur gut vermischt und im Soxhlet-Apparat nacheinander mit Äther, Essigäther, Aceton, Äthyl- und Methylalkohol erschöpft. Jedes der Lösungsmittel nahm aber entweder gar keine oder nur spurenweise feste Substanzen auf. Die Hydrolyse des Seidenfibroins bei diesen Versuchen war wohl nicht bis zur genügenden Tiefe

gegangen, und der Umstand, dass der mehrmals ausgewaschene Barytniederschlag noch eine recht starke Millonsche Reaktion gab, zeigt, dass die Hauptmenge der noch hochmolekularen Abbauprodukte bei der Neutralisation ausschied und mit dem Barytniederschlag unlöslich blieb.

Um diese Verhältnisse eingehend auseinanderzusetzen, wurde der Fortschritt der Hydrolyse des Fibroins durch konzentrierte und 70%ige Schwefelsäure zeitlich verfolgt. Als Mass für den Grad der Spaltung dienten die Biuretreaktion und die Menge der in Freiheit gesetzten Aminogruppen.

Das Seidenfibroin wurde in der 5 fachen Menge konzentrierter oder 70%iger Schwefelsäure unter Kälteanwendung gelöst und im Eisschrank bei 7–8° aufbewahrt. Im Laufe mehrerer Wochen wurde eine Reihe von Proben von Zeit zu Zeit entnommen, mit vielfachem Volumen Wasser verdünnt, mit Natronlauge unter Anwendung von Methylrot als Indikator neutralisiert und auf Amino- und Gesamtstickstoff untersucht. Der Aminostickstoff wurde nach der Methode von Van Slyke und der Gesamtstickstoff mittels Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Daneben wurden andere Hydrolysenversuche angestellt, indem man das Wasser der 70%igen Säure teilweise oder vollständig durch Glycerin ersetzte. Bei vollständigem Ersetzen des Wassers durch Glycerin trat aber das vollständige Lösen des Fibroins unter Kälteanwendung nicht ein und deshalb musste dieses Experiment aufgegeben werden.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle I zusammengestellt (vgl. Figur 1).

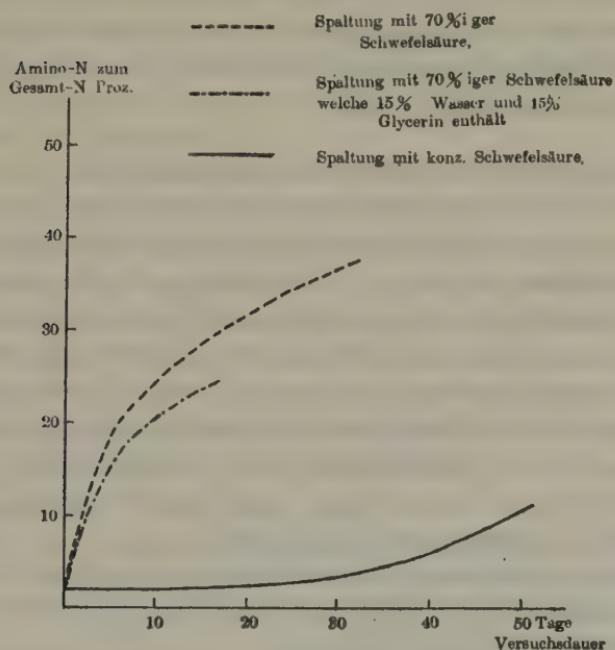
Aus der Tabelle I, und der Figur 1 ergibt sich, dass die freien Aminogruppen bei der Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure ungleich viel grösseren Zuwachs zeigten als bei der mit konzentrierter Säure. Besonders auffallend war die Zunahme der Aminogruppen in den ersten 10 Tagen, um bei fortschreitender Hydrolyse immer geringeren Zuwachs zu zeigen. Durch 70%ige Säure war nämlich die Hydrolyse schon nach 10 Tagen so tief fortgeschritten, dass der Aminostickstoff 25 Proz. des Gesamtstickstoffes ausmachte, während bei der Spaltung mit konzentrierter Säure der Aminostickstoffgehalt nach 20 Tagen nur 2–3 Proz. des Gesamtstickstoffes

TABELLE I.  
Spaltung des Seidenfibroins mit 70%iger und konzentrierter  
Schwefelsäure bei 7-8°.

Versuchs-dauer Tage	Spaltung mit konzentrierter Schwefelsäure		Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure		Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure, welche 15% Wasser und 15% Glycerin enthält	
	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuret- reaktion	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuret- reaktion	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuret- reaktion
1	1.86	+				
2	1.65	+	10.40	+	11.36	+
3	1.79	+				
4	1.61	+	16.41	+	14.49	+
6	1.47	+				
7			21.71	+	18.33	+
8	1.91	+				
11	1.71	+				
12			26.57	+		
15	2.27	+				
17	3.44	+			24.52	+
19	2.93	+				
21	3.47	+				
24	2.66	+				
27	2.98	+				
31			37.39	+		
34	4.11	+				
39	5.31	+				
53	11.39	+				

betrug und noch keine merkliche Zunahme zeigte. Diese Verhältnisse zeigen, dass die Spaltung des Seidenfibroins entgegen meiner Vermutung viel schneller und tiefer herbeigeführt wird, wenn in der Schwefelsäure eine gewisse Menge von Wasser zugegen ist. Ferner kann man ersehen, dass der Verlauf der Hydrolyse eine gewisse Hemmung erleidet, wenn man einen Teil des Wassers durch Glycerin ersetzt. Es muss hier noch erwähnt werden dass bei den obigen drei Versuchsserien die Biuretreaktion während des

Fig. 1.  
Spaltung des Seidenfibroins mit 70%iger und konzentrierter  
Schwefelsäure bei 7–8°.



ganzen Verlaufes immer positiv ausfiel.

Es ergab sich, dass die Spaltung der Proteine durch konzentrierte Schwefelsäure nur in geringem Masse vor sich geht. Ein solches Verfahren erwies sich mithin als ungeeignet für die Gewinnung von partiellen Spaltprodukten. Aus dem Resultat der vorliegenden Versuche kann man sich aber den Mechanismus der Säurespaltung der Proteine und des Auftretens von Diketopiperazinen in den Abbauprodukten folgendermassen vorstellen. Zuerst werden die langen Polypeptidketten des Eiweissmoleküls unter Eintritt des Wassers gesprengt. Für diesen hydrolytischen Vorgang ist natürlich die Gegenwart einer gewissen Menge Wassers massgebend. Der Umstand, dass das Eiweiss durch verdünntere Schwefelsäure viel schneller und tiefer hydrolysiert wird als durch die konzentrierte kann man durch diese Annahme erklären. Auch beim partiellen Ersetzen des Wassers durch Glycerin muss der

Grad der Hydrolyse herabgesetzt werden. Die durch diesen primären hydrolytischen Vorgang entstehenden Produkte (Di- und Polypeptide) wandeln sich dann einerseits unter sekundärem Wasseraustritt in Diketopiperazine, wobei die Säure im Gegensatz zum primären Prozess anhydrisierend einzuwirken scheint, andererseits in freie Aminosäuren um.

#### IV. SPALTUNG DES SEIDENFIBROINS NACH DER METHODE VON SSADIKOW UND ZELLINSKY.

Zwei russische Autoren, Ssadikow und Zellensky haben zur partiellen Aufspaltung von Gänsefedern eine Methode verwendet, welche darin besteht, dass die Proteine mit 0.5 bis 1%iger Salzsäure im Autoklaven 6 Stunden auf 180° erhitzt und die abiuret gewordenen Reaktionsprodukte mit Äther, Essigäther, Chloroform und schliesslich mit Amylalkohol extrahiert werden. Aus diesen Auszügen wurden neben verhältnismässig geringer Menge der freien Aminosäuren eine Anzahl von Aminosäure-anhydriden in guter Ausbeute gewonnen.

Abderhalden und Komm (1924) haben dieses Verfahren auf Seidenfibroin angewandt. Es wurden von ihnen als einheitlich charakterisierte Produkte gewonnen:

1. Ein aus einem Molekül Serin, drei Molekülen Alanin und einem Molekül Glykokoll bestehendes anhydridartiges Produkt.
2. Anhydrid des Glykokolls und Alanins.
3. Ein Anhydrid, bestehend aus je einem Molekül Glykokoll, Alanin und Serin.
4. Alaninanhydrid.

Alle diese Produkte enthalten als Bausteine nur Glykokoll, Alanin und Serin. Die Fraktionen, welche Millionsche Reaktion zeigten, waren aber sehr schwer zu reinigen und nichts wurde als ein Produkt von bestimmter Struktur charakterisiert.

Gawrilow, Stachejewa, Titowa und Ewergetowa (1927) haben mitgeteilt, dass während des Verlaufes von Autoklavenhydrolyse der Gelatine nach der Methode von Ssadikow und Zellinsky sich ein Moment beobachten lässt, in dem die Biuretreaktion eben verschwindet und die Hydrolyse bei weiterem

Erwärmung oder Temperaturerhöhung schon mit grosser Mühe fortschreitet. Da die Biuretreaktion im allgemeinen denjenigen Polypeptiden zukommt, in denen drei oder mehr Aminosäuren in Bindung enthalten sind, scheinen in diesem eben abbiuret gewordenen Moment die Aminosäuren in den Abbauprodukten vorwiegend in Form von Dipeptiden, Diketopiperazinen oder als freie Aminosäure vorhanden zu sein.

Um die Versuchsbedingung ausfindig zu machen, welche die Aufspaltung des Fibroins eben bis zu diesem Zustand herbeiführt, wurden zuerst orientierende Versuche ausgeführt, indem man das Seidenfibroin mit der zehnfachen Menge verdünnter Schwefelsäure wechselnder Konzentration auf 170° erhielt, von Zeit zu Zeit eine Probe entnahm, filtrierte und auf die Biuretreaktion prüfte. In Fällen, wo die Lösung stark gefärbt war, wurde sie zuvor mit Tierkohle behandelt. Auf diese Weise wurde der Zeitpunkt festgestellt, in dem die Biuretreaktion eben verschwindet.

TABELLE II a.

Spaltung des Seidenfibroins mit verdünnter Schwefelsäure bei 170°.  
5 g Seidenfibroin in 50 ccm verdünnter Schwefelsäure.

Konzentration der Säure	Biuretreaktion		
	Erhitzungsdauer (Stunden)		
	3 <sup>h</sup> 30'	5 <sup>h</sup>	7 <sup>h</sup> 30'
0.025 n	+	+	+
0.05 n	+	+	+
0.1 n	+	+	+
0.2 n	+	Schwach	—
0.4 n	—	—	—

TABELLE II b.

Spaltung des Seidenfibroins mit verdünnter Schwefelsäure bei 170°.  
5 g Seidenfibroin in 50 ccm verdünnter Schwefelsäure.

Konzentration der Säure	Biuretreaktion		
	Erhitzungsdauer (Stunden)		
	7 <sup>h</sup> 30'	10 <sup>h</sup>	12 <sup>h</sup> 30'
0.10 n	+	+	Schwach
0.15 n	+	Schwach	—
0.20 n	—	—	—

Wie aus der Tabelle IIa ersichtlich, gab die Hydrolysenflüssigkeit bei der Spaltung mit 0.4 n-Schwefelsäure schon nach  $2\frac{1}{2}$  Stunden keine Biuretreaktion. Bei der Spaltung mit 0.2 n-Säure wurde die Reaktion nach 5 Stunden sehr schwach, während durch 0.1 n und noch verdünntere Säure die Reaktion nach  $7\frac{1}{2}$  stündigem Erhitzen noch positiv ausfiel.

In der Tabelle IIb ist das Verhalten der Biuretreaktion bei der Hydrolyse mit 0.10, 0.15 und 0.20 n-Säuren im Laufe von  $7\frac{1}{2}$  bis  $12\frac{1}{2}$  Stunden verzeichnet. Es wurde festgestellt, dass die Erhitzungsdauer zur Erreichung des abiureten Zustandes bei der Spaltung mit 0.15 n-Säure  $12\frac{1}{2}$  Stunden in Anspruch nahm, während durch 0.10 n-Säure die Biuretreaktion nach  $12\frac{1}{2}$  stündigem Erhitzen noch bestehen blieb.

#### *A. Spaltung durch verdünnte Schwefelsäure.*

Um den Fortschritt der Spaltung des Seidenfibroins unter verschiedenen Bedingungen zu ermitteln und dadurch Aufschluss über die bei der Spaltung erfolgenden Veränderungen der Verkettungsweise der Aminosäuren zu erlangen, wurde die Hydrolyse des Seidenfibroins bei  $170^\circ$ , unter verschiedener Säurekonzentration und bei verschiedener Erhitzungsdauer zeitlich verfolgt.

Hierzu wurden mit Rücksicht auf das Ergebnis des orientierenden Versuches 0.10, 0.15, 0.175 und 0.20 n-Schwefelsäuren verwendet. Die Hydrolyse des Seidenfibroins wurde derart ausgeführt, dass es mit der zehnfachen Menge der Schwefelsäurelösung verschiedener Konzentration im Autoklaven auf  $170^\circ$  erhitzt wurde. Mit dem Fortschreiten der Hydrolyse ging das Fibroin allmählich in Lösung und die Flüssigkeit färbte sich zunächst bräunlich gelb, dann dunkelbraun. Um die Tiefe der Aufspaltung zu kontrollieren, wurden die Biuretreaktion und der Gehalt der Hydrolysenflüssigkeit an Amino- und Gesamtstickstoff ermittelt. Die von Zeit zu Zeit der Versuchslösung entnommenen Proben wurden nämlich von dem ungelöst gebliebenen Fibroin abfiltriert und mit verdünnter Natronlauge unter Anwendung von Methylrot als Indikator neutralisiert. Sie wurden auf Biuretreaktion geprüft, ihr Aminostickstoff titrimetrisch nach Linderström-Lang (1928) und ihr

Gesamtstickstoff mittels Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle III und der Figur 2 zusammengestellt.

Aus der Tabelle und der Figur kann folgendes abgelesen werden:

1. Bei der Spaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure steigerte sich der Prozentsatz des Aminostickstoffs zum Gesamtstickstoff mit der Zeit, um nach 10 bis 12½ Stunden konstant zu werden. Der abiurete Zustand der Lösung wurde nicht erreicht.

2. Bei der Hydrolyse mit 0.15 n-Säure erreichte das Aminostickstoffprozent nach dem anfänglichen steilen Zuwachs binnen 7½ bis 10 Stunden einen konstanten Wert (ca. 42 Proz.) und die Biuretreaktion fiel allmählich negativ aus, mit keiner Veränderung im Aminostickstoffprozent.

3. Bei Anwendung von 0.175 n-Säure gestaltete sich das Bild des Hydrolysenverlaufes sehr charakteristisch. Der Aminostickstoff zeigte nach 7½ bis 10 stündiger Spaltung einen konstanten Wert (ca. 42–43 Proz.) und zugleich verschwand die Biuretreaktion. Bei fortgesetztem Erhitzen zeigte aber der Aminostickstoffwert einen noch weiteren Anstieg.

4. Durch Einwirkung noch stärkerer Säure schritt die Hydrolyse so schnell fort, dass die Biuretreaktion schon nach 5 Stunden sehr schwach wurde oder verschwand. Nach dem Verschwinden der Biuretreaktion steigerte sich der Aminostickstoffwert weiter fort und bei Verwendung von 0.21 n-Säure erlangte der Aminostickstoffwert ca. 49 Proz.

Die gestrichelte Linie in der Figur 2 zeigt die Grenze unterhalb deren die Biuretreaktion immer positiv ausfällt.

Es muss noch bemerkt werden, dass der hier erwähnte Aminostickstoffwert den Prozentsatz des Aminostickstoffs zum Gesamtstickstoff der Hydrolysenflüssigkeit angibt und deshalb von den folgenden Faktoren beeinflusst wird. Bei der Behandlung des Seidenfibroins mit verdünnter Säure tritt die Auflösung desselben langsam ein. Noch langsamers, aber schritt die Spaltung dieser zunächst noch ziemlich hochmolekularen Spaltprodukte fort, und dementsprechend bleibt der relative Aminostickstoffwert ziemlich klein.

TABELLE III.  
Spaltung des Seidenfibroins mit 0.10, 0.175 und 0.20 n-Schwefelsäure bei 170.  
20 g Seidenfibrin in 200 ccm verdünnter Schwefelsäure.

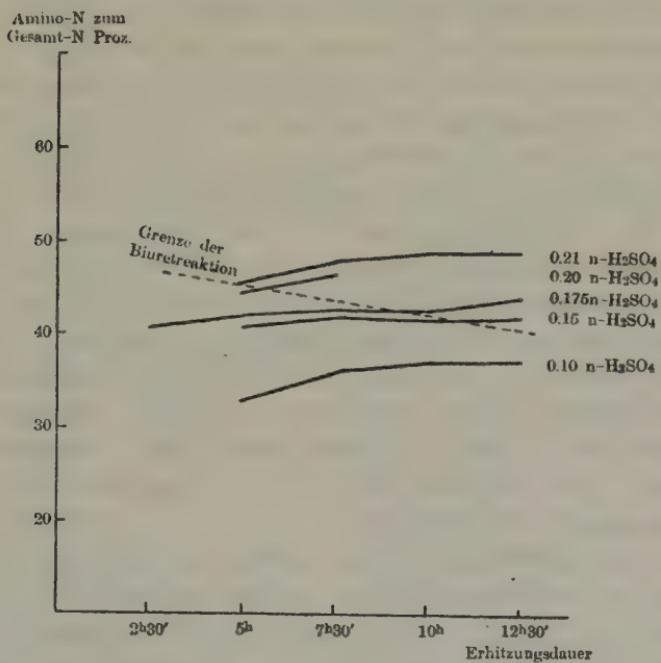
Versuchsdauer Stunden	Spaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure			Spaltung mit 0.15 n-Schwefelsäure		
	Gesamt-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion	Gesamt-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'						
5h	1.116	32.71	+	1.185	40.53	+
7h 30'	1.190	35.92	+	1.198	41.76	+
10h	1.246	37.00	+	1.270	41.43	Schwach
12h 30'	1.272	36.97	+	1.369	41.58	-

Versuchsdauer Stunden	Spaltung mit 0.175 n-Schwefelsäure			Spaltung mit 0.20 n-Schwefelsäure			Spaltung mit 0.21 n-Schwefelsäure		
	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuret- reaktion	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuret- reaktion	Gesamt-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuret- reaktion		
2h 30'									
5h	40.47	+							
7h 30'	41.77	+	44.63						
10h	42.45	Schwach	46.38						
12h 30'	42.63	-							
	44.00	-							

Fig. 2.

Spaltung des Seidenfibrins mit verdünnter Schwefelsäure bei 170°.



Zu dem Masse, in dem das gelöste hochmolekulare Spaltprodukt weiter aufgespalten wird, steigert sich der Wert des freien Aminostickstoffs. Gleichzeitig ist eine Möglichkeit der Anhydrisierung der in Freiheit gesetzten Amino- und Karboxylgruppen eingeschaltet, die einen Gegensatz zu der Aminostickstoffzunahme bildet.

Es wurde an obigen Versuchen festgestellt, dass der Aminostickstoff bei der Spaltung mit 0.15 n-Schwefelsäure nach 10 Stunden und bei der mit 0.175 n-Säure nach 7½ Stunden eine zeitlang konstanten Wert zeigt, und die Biuretreaktion stets während dieses konstanten Verlaufes verschwindet. Die Geschwindigkeit der Aufspaltung der höheren Moleküle und der Anhydrisierung müssen daher in diesem Zeitraum Schritt halten. Der Aminostickstoff betrug in diesem eben abiuret gewordenen Moment 42–43 Proz. des Gesamtstickstoffs.

*B. Spaltung durch verdünntes Alkali.*

In den vorangehenden Versuchen wurde zur Hydrolyse des Seidenfibroins verdünnte Schwefelsäure verwendet. Anschliessend an diese Versuche wurde in der vorliegenden Untersuchung an Stelle von Säure verdünnte Natronlauge zur Spaltung benutzt. Zunächst wurde das Fibroin der Wirkung von verdünnten Alkalien wechselnder Konzentration (0.025 bis 0.15 n) ausgesetzt und der Fortschritt der Hydrolyse mit der Zeit aus der Zunahme der freiwerdenden Aminogruppen verfolgt. Je 15 g Seidenfibroin wurden mit der 10 fachen Menge 0.025, 0.05, 0.10 und 0.15 n-Natronlauge im Autoklaven auf 170° erhitzt. Nach einem Interval von je 2½ Stunden Erhitzung wurde eine Probe entnommen, filtriert und mit 0.1 n-Schwefelsäure gegen Methylrot neutralisiert. Es wurde auf Biuretreaktion geprüft und der Amino- und Gesamtstickstoff bestimmt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle IV zusammengestellt (vgl. Fig. 3).

In der Figur 3 sind neben den Kurven, welche bei der Einwirkung von verdünnten Alkalien erhalten wurden, auch diejenigen aufgezeichnet, welche bei der Säurehydrolyse angegeben wurden, um den Vergleich mit dem Ergebnis der Säurespaltung zu gestatten. Die gestrichelten Linien I und II zeigen die Grenze des positiven und negativen Gebietes der Biuretreaktion sowohl bei der Säure- wie bei der Alkalispaltung.

Aus der Tabelle und der Figur kann man folgende Schlüsse ziehen:

- Bei der Säurespaltung steigerte sich, wie zuvor mitgeteilt, der Aminostickstoff am Anfang der Hydrolyse in erheblichem Masse, um danach einen nahezu konstanten Verlauf zu zeigen. Dementgegen zeigte sich im Falle der Alkalispaltung eine weit schnellere und stetige Zunahme des Aminostickstoffes, die diejenigen der Säurespaltung erheblich überstiegen. Dies ist so zu deuten, dass bei der Alkalihydrolyse eine bedeutend geringere Anhydridbildung erfolgt als bei der mit Säure.

- Die Biuretreaktion verschwand bei der Säurespaltung zu dem Zeitpunkt, als nahezu ein Stillstand in dem Zuwachs des

TABELLE IV.  
Spaltung des Seidenfibroins mit 0.025, 0.05, 0.10 und 0.15 n-Natronlauge bei 170°.  
15 g Seidenfibrin in 150 ccm Natronlauge.

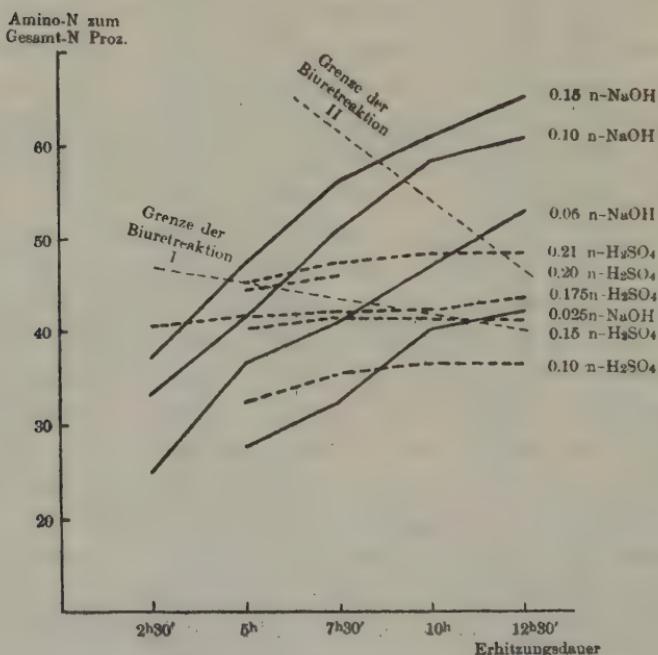
Versuchsdauer Stunden	Spaltung mit 0.025 n-Natronlauge			Spaltung mit 0.05 n-Natronlauge		
	Gesamt-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion	Gesamt-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'	0.985	28.05	++	1.153	25.17	+++
5h	1.199	32.72	++	1.213	37.03	++
7h 30'	1.304	40.49	+	1.370	41.51	+
10h	1.455	42.51	±	1.416	47.58	±
12h 30'				1.450	53.58	-

Versuchsdauer Stunden	Spaltung mit 0.10 n-Natronlauge			Spaltung mit 0.15 n-Natronlauge		
	Gesamt-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion	Gesamt-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biuretreaktion
2h 30'	1.219	33.16	+++	1.415	37.13	++
5h	1.402	41.85	++	1.465	47.41	+
7h 30'	1.433	51.28	+	1.489	56.43	+
10h	1.488	58.62	-	1.527	61.12	-
12h 30'	1.486	61.32	-	1.549	65.48	-

Fig. 3.

Spaltung des Seidenfibroins mit verdünnter Natronlauge  
(und Schwefelsäure) bei 170°.



Aminostockstoffes eintrat (42–43 Proz. des gesamten in Lösung gegangenen Stickstoffes bei der Hydrolyse mit 0.15–0.175 n-Säuren), während bei der Alkalispaltung die Reaktion viel länger bestehen blieb, u.z. bis der Aminostickstoff sich über 50 bis 60 Proz. steigerte. Es zeigte sich ferner, dass die bei der Biuretreaktion auftretende violette Farbe bei der Säurespaltung einen viel rötlicheren, bei der Alkalispaltung dagegen einen viel bläulicheren Ton aufweist.

Auf Grund dieser vergleichenden Hydrolyse des Seidenfibroins durch Säure und Alkali wurde festgestellt, dass die Spaltung des Fibroins durch Alkali viel rascher erfolgt als durch Säure. Ferner scheint die Anhydrisierung der dabei auftretenden Peptide in alkalischer Lösung in geringerem Grade vor sich zu gehen als bei saurer, da ein Stillstand der Zunahme des Aminostickstoffs bei der Alkalispaltung nicht konstatiert werden konnte. Einerseits um

diese Verhältnisse klar zu stellen, andererseits um noch die zeitlichen Mengenverhältnisse der gebildeten Spaltungsprodukte bei der Säure- und Alkalispaltung ausfindig zu machen wurden nachstehend die Abbauprodukte, welche bei der Hydrolyse des Fibroins mit verdünnter Schwefelsäure und Natronlauge in wechselnder Konzentration entstehen, in eine Reihe von Fraktionen getrennt und ihre chemische Zusammensetzung ermittelt.

V. FRAKTIONIERUNG UND ISOLIERUNG DER NACH DER METHODE  
VON SSADIKOW UND ZELLINSKY ENTSTEHENDEN  
ABBAUPRODUKTE DES SEIDENFIBROINS.

Die Aufspaltung des Seidenfibroins wurde nach dem Verfahren von Ssadikow und Zellinsky durch verdünnte Schwefelsäure und Natronlauge verschiedener Konzentration stufenweise ausgeführt, die entstehenden Abbauprodukte in verschiedene Fraktionen zerlegt und einerseits die chemische Zusammensetzung einzelner Fraktionen durch analytische Methoden ermittelt, andererseits aus diesen Fraktionen Abbauprodukte von bestimmter Struktur isoliert. Die Spaltung wurde zunächst mit 0.15 und 0.175 n-Schwefelsäure bei 170° unter Druck 10 bis 12½ Stunden bewerkstelligt, und zwar bis sich eben der abiurete Zustand erreichen liess.

A. Spaltung durch 0.15 und 0.175 n-Schwefelsäure.

40 g Seidenfibroin wurden mit 400 ccm 0.15 n-Schwefelsäure im Autoklaven 12½ Stunden auf 170° erhitzt. Das ungelöst gebliebene Fibroin wurde abfiltriert und mit heissem Wasser gewaschen. Das abiurete Filtrat wurde mit verdünnter Natronlauge neutralisiert und unter verringertem Druck bei nicht über 40° steigender Temperatur bis auf etwa 50 ccm eingeengt. Dabei schied sich eine kristallinische Substanz aus, welche beim Aufbewahren im Eisschrank von Tag zu Tag zunahm. Dieses Produkt wurde nach einigen Tagen abgesaugt, mit Wasser gewaschen und auf Ton scharf abgepresst. Seine Menge betrug 1.6 g (Fraktion A). Es wurde zur weiteren Reinigung aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle mehrmals umkristallisiert. Es bildeten sich farblose,

schöne bald als Nadeln bald als Plättchen auftretende Kristalle (Kristall I). Diese Substanz zeigte starke Millonsche und Pikrinsäurereaktion. Die Biuretreaktion fiel aber negativ aus. Das dreimal aus Wasser umkristallisierte Präparat schmolz bei 258° unter Zersetzung. Es zeigte aber noch Merkmale eines Gemisches, indem der Schmelzpunkt sich auf 261.5° steigerte wenn die Substanz mit einem Gemisch von gleichen Teilen Eisessig und Alkohol in Siedehitze digeriert und abermals aus Wasser umkristallisiert wurde. Für die Analyse wurde es bei 110° im Vakuum getrocknet.

0.0637 g Substanz gaben 0.1411 g CO<sub>2</sub> und 0.0314 g H<sub>2</sub>O.

Für C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub>

Ber.

Gef.

C	60.25%	C	60.37%
H	5.06%	H	5.52%
N	12.79%	N	13.03%

(Nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt).

Zur Ermittlung der Aminosäuren, aus denen diese Substanz besteht, wurde die totale Hydrolyse ausgeführt.

Totale Hydrolyse: 2 g Substanz wurden mit 15 ccm 5 n-Schwefelsäure am Rückflusskühler 18 Stunden im Sieden gehalten. Die Schwefelsäure wurde hierauf mit Baryt quantitativ ausgefällt und abgesaugt. Der Bariumsulfatniederschlag wurde dann so lange mit Wasser aufgekocht, bis das Waschwasser keine Reaktion mit Millons Reagens mehr ergab. Das Filtrat und die Waschungen wurden vereinigt und verdampft bis schon in der Wärme eine reichliche Kristallisation des Tyrosins eintrat. Die abgeschiedenen Tyrosinkristalle wurde nach einem Tage abgesaugt und aus Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert. Beim Einengen der Mutterlauge der Umkristallisation erfolgte wieder die Abscheidung einer kleinen Menge des Tyrosins. Die Ausbeute an reinem Tyrosin betrug im ganzen 1.336 g. Aus dem Filtrat des Tyrosins wurde das Glykokoll nach der Methode von Siegfried (1906) als Carbaminat abgeschieden. Das Carbaminat wurde durch Erwärmen mit Ammoniumcarbonat zersetzt und das Glykokoll mit Alkohol ausgefällt. Die Ausbeute an Glykokoll betrug 0.423 g. Durch Umfällen mit Alkohol aus wässriger

Lösung wurden grosse schöne Nadeln erhalten. Sie schmolzen unter Gasentwicklung bei 233.5°. Das Glykokoll wurde weiter als Pikrat identifiziert. Man löste das Produkt in wenig heissem Wasser und fügte das gleiche Volumen alkoholischer Pikrinsäure hinzu. Das Pikrat schied sich in Form von glänzenden, gelben Schuppen aus. Es schmolz unter Gasentwicklung bei 190°.

Da die Ausbeute an beiden Aminosäuren beträchtlich von der für Glycin-tyrosinanhydrid berechneten Menge abwich, wurde die Hydrolyse abermals vorgenommen. Aus 1 g Substanz wurde dabei nach der Hydrolyse 0.754 g Tyrosin erhalten und aus dem Filtrat des Tyrosins wurde dann durch Fällung mit Alkohol 0.301 g Glykokoll gewonnen. Das aus wässriger Lösung mit Alkohol umgefällte Glykokoll schmolz bei 235° unter Gasentwicklung und wies 18.08 Proz. Stickstoff auf. Das Tyrosin entsprach 84.0 Proz., das Glykokoll 81.0 Proz. der Theorie.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse und der totalen Hydrolyse sprechen dafür, dass hier ein Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins vorliegt. Der Schmelzpunkt liegt aber etwas niedriger als es bis jetzt für Glycin-tyrosinanhydrid angegeben wurde. Die Ursache dieses Umstandes liegt wohl darin, dass das Produkt mit einer kleinen Menge von Stoffen verunreinigt ist, die sich durch einfache Umkristallisation schwer entfernen lassen.

Die schwarzbraun gefärbte und stark fluoreszierende Mutterlauge der Fraktion A wurde im Flüssigkeitsextraktor nach Kumakawa-Suto 35 Stunden mit Essigäther erschöpft. Es schied sich von der Essigätherlösung eine beträchtliche Menge gelblicher Substanz ab, welche abgenutscht, auf der Tonplatte abgepresst und getrocknet wurde. Die Ausbeute an diesem Produkt war 7.9 g (Fraktion B).

Dieser Essigätherauszug (Fraktion B) wurde zur weiteren Reinigung in Wasser gelöst, mit Tierkohle aufgekocht und filtriert. Da beim allmählichen Einengen keine Abscheidung fester Substanz erfolgte, wurde es bis zur Trockenheit verdampft und der gelbliche Rückstand wiederholt aus Alkohol unter Anwendung von Tierkohle umkristallisiert. Die zunächst stark auftretende Millionsche Reaktion wurde dabei immer schwächer und nach viermaliger Um-

kristallisation wurde unter beträchtlichem Substanzverlust ein Produkt erzielt, das keine Millonsche Reaktion mehr ergab (Kristall III). Es schmeckte bitter, schmolz bei 238° unter Zersetzung und ergab starke Carbonyl- aber keine Biuretreaktion. Die Mischprobe mit dem zuvor durch Glycerinbehandlung erhaltenen Glycin-alanin-anhydrid ergab keine Erniedrigung des Schmelzpunktes.

0.0611 g Substanz gaben 0.1064 g  $\text{CO}_2$  und 0.0339 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Für C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	Ber.	Gef.
	C 46.85%	C 46.69%
	H 6.30%	H 6.21%

0.0859 g Substanz gaben 17.01 ccm N<sub>2</sub> bei 24.5° und 760,2 mm Hg.

Für C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	Ber.	Gef.
	N 21.84%	N 22.03%

Die Bestimmung des Molekulargewichtes ergab 133.0. Berechnet für  $C_5H_8O_2N_2$ : 128.1

Die Analysenergebnisse sprechen dafür, dass hier ein aus Glykokoll und Alanin bestehendes Anhydrid vorliegt.

Während der Prozess der Extraktion mit Essigäther noch im Gang war, schied sich an der Gefäßwand des Extraktors, welcher die der Extraktion untergeworfene wässrige Lösung enthielt, bald eine Kruste von bräunlich gelber Substanz ab, welche allmählich zunahm (Fraktion C). Sie wurde abfiltriert, in möglichst kleiner Menge heißen Wassers aufgenommen, mit Tierkohle behandelt und zur Kristallisation stehen gelassen. Beim Abkühlen kristallisierte eine Substanz von feinen, seidenglänzenden und biegsamen Nadeln aus (Kristall IV). Das abermals aus Wasser umkristallisierte Produkt schmolz bei 291–292° unter Zersetzung. Es war schwer löslich in Wasser und zeigte starke Millionsche Reaktion. Die Carbonylreaktion fiel aber negativ aus.

0.0499 g Substanz gaben 0.1093 g  $\text{CO}_2$  und 0.0263 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Für C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> N	Ber.	Gef.
	C 59.64%	C 59.64%
	H 5.57%	H 5.91%

Alle diese Eigenschaften und die chemische Zusammensetzung decken sich gut mit Tyrosin.

Gleichzeitig wurden 60 g Seidenfibroin mit 0.175 n-Schwefelsäure bei 170° während 10 Stunden aufgespalten. Es gingen dabei 78.68 Proz. des Stickstoffes in Lösung. Beim Einengen der neutralisierten Hydrolysenflüssigkeit schied sich eine kristallinische Substanz aus. Sie wog 2.0 g und gab starke Millonsche und Carbonylreaktion (Fraktion A). Das zweimal aus Wasser umkristallisierte Produkt schmolz bei 258° und erwies sich identisch mit dem oben erwähnten Kristall I.

Der aus der Mutterlauge erhaltene Essigätherauszug (Fraktion B) betrug 12.0 g und zeigte die Carbonyl- und Millonsche Reaktion. Die Biuretreaktion fiel aber negativ aus. 5 g Essigätherauszug wurden zur weiteren Fraktionierung mit 200 ccm Wasser unter Zusatz von Tierkohle aufgekocht und filtriert. Es wurde dann auf 50–60 ccm eingeengt und stehen gelassen, wobei sich eine reichliche Menge von kristallinischen Nadeln ausschied (Fraktion B<sub>1</sub>). Die Ausbeute an dieser Substanz betrug 0.8 g. Das nochmals aus Wasser umkristallisierte Produkt schmolz bei 272° unter Zersetzung (Kristall II). Es gab sehr starke Millonsche und Pikrinsäurereaktion und die bei 110° im Vakuum getrocknete Substanz ergab sich bei folgender Analyse als ein Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins.

0.0504 g Substanz gaben 0.1114 g CO<sub>2</sub> und 0.0259 g H<sub>2</sub>O.

Für C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	Ber.	Gef.
	C 60.25%	C 60.27%
	H 5.06%	H 5.75%
	N 12.79%	N 12.69%

(Nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt).

Das Filtrat von Fraktion B<sub>1</sub> wurde bis zur Trockenheit verdampft. Aus dem gelblich gefärbten Rückstand (Fraktion B<sub>2</sub>), der noch eine ziemlich starke Millonsche Reaktion ergab, wurde nach viermaligem Umkristallisieren aus Alkohol ein Produkt gewonnen, das keine Millonsche Reaktion mehr ergab. Es schmolz bei 238° und ergab positive Carbonyl- aber negative Biuretreaktion. Wie die folgende Analyse zeigt, liegt hier ohne Zweifel ein Anhydrid von Glykokoll und Alanin vor (Kristall III).

0.0560 g Substanz gaben 0.0966 g CO<sub>2</sub> und 0.0304 g H<sub>2</sub>O.

Für C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>

Ber.

Gef.

C 46.85% C 46.75%

H 6.30% H 6.08%

Aus der wässerigen Restlösung der Essigätherextraktion schieden sich bei mehrätigem Stehen schwer in Wasser lösliche und nach Millon stark positiv reagierende Kristalle ab. Sie wog 0.3 g und wurde identifiziert als Tyrosin (Fraktion C).

Die schwarzbraune Mutterlauge wurde hierauf zur weiteren Fraktionierung mit Wasser verdünnt und mit Tierkohle aufgekocht. Das Filtrat wurde nach Einengen bis zu Sirup mit einer etwa 9 fachen Menge absoluten Alkohols versetzt und der dabei abgeschiedene Niederschlag abgesaugt. Es wurde mehrmals mit 90 %igem Alkohol digeriert und der Rückstand getrocknet (Fraktion D). Diese Fraktion wog 11.0 g und ergab sehr schwache Millonsche und Carbonylreaktion. Demgegenüber zeigte die alkoholische Mutterlauge eine starke Pikrinsäurereaktion. Beim Einengen dieser alkoholischen Lösung verblieb ein stark gefärbter Sirup, in dem sich nach einigen Tagen gelbliche kristallinische Produkte abschieden. Sie wurden abgesaugt, auf Ton abgepresst und getrocknet (Fraktion E). Diese Fraktion E wog 4.1 g. Durch Umkristallisation aus Alkohol unter Zusatz von Tierkohle wurden daraus schöne Nadeln gewonnen, welche starke Carbonyl- aber keine Millonsche Reaktion zeigten. Sie schmolzen unter Zersetzung bei 238° und durch Mischprobe mit dem Kristall II wurde festgestellt, dass hier ein Anhydrid des Glykokolls und Alanins vorliegt. Das Filtrat dieser Fraktion E stellte einen schwarzbraunen Sirup dar und ergab die Millonsche aber eine sehr schwache Pikrinsäurereaktion (Fraktion F). Die Biuretreaktion fiel schwach positiv aus.

Um Aufschlüsse über die Natur der sämtlichen bei der Spaltung auftretenden Abbaufractionen zu erlangen, wurde der Amino- und Gesamtstickstoff in allen diesen Fraktionen ermittelt. Das Ergebnis ist in der Tabelle V zusammengestellt.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass die Fraktionen A und B keine freie Aminogruppe enthalten und ausschliesslich aus Dike-

TABELLE V.

Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten des Seidenfibroins. 10 stündige Spaltung von 60 g Seidenfibroin mittels 0.175 n-Schwefelsäure bei 170°.  
(In Lösung gegangener N betrug 78.68%).

	Fraktionen	Aus-beute g	Gesamt-N Proz.	Amino-N Proz.	Amino-N zum Ges.-N Proz.	a) Biuretreaktion b) Carbonylreaktion c) Millionsche Reaktion
A	Beim Einengen abgeschiedene Fraktion	2.0 g	12.59	0	0	b) ++ c) +++
B	Essigätherauszug der Mutterlauge	12.0 g	18.32	0	0	a) - b) ++ c) ++
B <sub>1</sub>	In Wasser schwer löslicher Teil der Fraktion B	1.93 g	12.69	0	0	b) ++ c) +++
B <sub>2</sub>	In Wasser löslicher Teil der Fraktion B		19.05	0	0	b) ++ c) ++
C	Aus der Restlösung der Fssigätherextraktion abgeschiedene Fraktion	0.3 g				b) - c) +++
D	In Alkohol unlöslicher Teil der von Fraktion C abgetrennten Restlösung	11.0 g	15.89	12.89	81.16	a) - b) ± c) ±
E	Aus dem Filtrat von D nach Austreiben des Alkohols allmählig abgeschiedener Teil	4.1 g	20.21	1.46	7.20	a) - b) ++ c) +
F	Von E abgetrennter sirupöser Rückstand		Gesamt-N 0.956 g Amino-N 0.316 g		33.10	a) ± b) + c) ++

topiperazinen zu bestehen scheinen. Der Stickstoffgehalt der Fraktion A zeigt, dass diese Fraktion vorwiegend aus Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins besteht. Aus Fraktion B wurden, wie soeben dargelegt, Glycin-tyrosinanhidrid und Glycin-alaninan-

hydrid ( $B_2$ ) isoliert.

Die Fraktion C besteht zweifellos aus Tyrosin. Der Aminostickstoff der Fraktion D machte 81.16 Proz. des Gesamtstickstoffes aus. Sie scheint deshalb neben kleinen Teilen von Dipeptiden und Diketopiperazinen der Hauptmenge nach aus einer Mischung von freien Aminosäuren zu bestehen. Die Fraktion E weist dagegen nur eine spärliche Aminostickstoffmenge auf. Hier handelt es sich wieder um Anhydride, da einerseits der Stickstoffgehalt dem Anhydrid des Glykokolls und Alanins ziemlich nahe kommt und andererseits das betreffende Anhydrid daraus tatsächlich sich isolieren liess.

Die Fraktion F, welche eine sehr schwache Carbonylreaktion ergab, enthält mit grosser Wahrscheinlichkeit vorwiegend eine Reihe von Dipeptiden.

Durch die eben dargelegten Operationen wurden bei der Spaltung des Seidenfibroins mittels 0.15–0.175 n-Schwefelsäure die Diketopiperazine erhalten, welche aus zwei Aminosäuren bestehen. Die Anhydridkomplexe, die mehr als zwei Aminosäuren in Bindung enthalten, liessen sich nicht isolieren. Dies röhrt wohl daher, dass der Abbau des Fibroins zu weit gegangen ist. Es wurde nachstehend die Spaltung mit 0.1 n-Schwefelsäure ausgeführt. Es kann nun auch die Frage aufgeworfen werden, wie sich die Sache bei den durch noch stärkere Säure aufgespaltenen Fällen verhalten würde. Es wurde daher die Spaltung auch mit 0.2 n-Säure ausgeführt und die entstehenden Abbauprodukte in gleicher Weise in eine Reihe von Fraktionen zerlegt.

#### *B. Spaltung durch 0.1 n-Schwefelsäure.*

60 g Fibroin wurden mit der 10 fachen Menge 0.1 n-Schwefelsäure 10 Stunden auf 170° erhitzt. Dabei gingen 73.50 Proz. des Stickstoffes in Lösung. Das Filtrat von rückständigem Fibroin wurde mit Natronlauge neutralisiert und auf etwa 80 ccm im Vakuum eingeengt. Der dabei abgeschiedene kristallinische Niederschlag (Fraktion A) betrug 1.7 g. Das aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkristallisierte Produkt schmolz bei 258° unter Zersetzung und erwies sich als identisch mit dem früher erhaltenen

## Kritsall II (Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins).

Die Mutterlauge wurde mit Essigäther ausgezogen. Der gelbliche Auszug (Fraktion B) wog 11.5 g. 5 g dieser Substanz wurden im Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt und nach Einengen auf ein kleines Volumen stehen gelassen. Aus der Lösung schied sich eine geringe Menge weißer Substanz ab, welche 0.15 g wog (Fraktion B<sub>1</sub>). Das aus Wasser umkristallisierte Produkt schmolz gegen 270° (Kristall II). Es liegt Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins vor. Die Mutterlauge dieser Substanz wurde bis zur Trockenheit verdampft (Fraktion B<sub>2</sub>) und wiederholt aus Alkohol umgelöst. Nach 4 maliger Umkristallisation wurde die Substanz erhalten, welche keine Millionsche Reaktion mehr gab. Sie schmolz bei 238° unter Zersetzung und erwies sich als Anhydrid des Glykokolls und Alanins (Kristall III).

Aus der Restlösung des Essigätherauszuges schied sich beim Stehen eine kristallinische Substanz aus (Fraktion C), welche nach der Umkristallisation als Tyrosin identifiziert wurde. Die Ausbeute betrug 0.2 g (Kristall IV).

Das Filtrat der Tyrosinfraktion wurde mit Wasser verdünnt, mit Tierkohle behandelt und bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Es wurde dann mit mehrfacher Menge Alkohol versetzt. Dabei schied sich eine feine flockige Substanz aus, welche mehrmals mit Alkohol gewaschen, abgesaugt und getrocknet wurde. Sie betrug 5.5 g und gab schwache Biuretreaktion (Fraktion D).

Beim Abdampfen der alkoholischen Mutterlauge verblieb ein gelblicher sirupöser Rückstand. Beim Stehen schied sich daraus eine kristallinische Substanz aus, welche 1.7 g wog (Fraktion E). Einmalige Umkristallisation aus Alkohol genügte, um eine vollkommen tyrosinfreie Substanz zu erhalten. Sie schmolz bei 239° unter Zersetzung und erwies sich als Glycin-alaninanhydrid.

Das sirupöse Filtrat (Fraktion F) ergab starke Biuret- und sehr schwache Pikrinsäurereaktion. Zur weiteren Fraktionierung wurde es in 5%iger Schwefelsäure gelöst und mit einer konzentrierten Lösung von Phosphorwolframsäure so lange versetzt, bis die filtrierte Lösung keine Fällung mehr ergab. Der Niederschlag wurde nach 24 Stunden abgesaugt und mit 5%iger

Schwefelsäure gewaschen. Er wurde hierauf in einer Reibschale zerrieben und mit heiss gesättigter Barytlösung versetzt, bis die Lösung deutlich alkalisch reagierte. Die dabei entstehenden Niederschläge von Bariumwolframat wurden abgesaugt und mehrmals mit barytalkalischer Wasser ausgezogen. Von dem alkalischen Filtrat wurde dann der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure quantitativ entfernt und die filtrierte Lösung im Wasserbad eingeengt. Der Rückstand war ein braun gefärbter Sirup (Fraktion F<sub>1</sub>). Er enthielt 0.125 g Stickstoff und zeigte starke Biuret- und Millonsche Reaktion.

Die Mutterlauge, welche die mit Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkte enthielt, wurde mit überschüssigem Baryt versetzt, dann der Baryt sorgfältig mit Schwefelsäure entfernt und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand war ein gelbbrauner Sirup (Fraktion F<sub>2</sub>). Er enthielt 0.279 g Stickstoff und zeigte schwache Biuret- und Millonsche Reaktion.

Es wurden der Gesamt- und Aminostickstoff in allen diesen Fraktionen bestimmt (siehe Tabelle VI).

Aus den Stickstoffverteilungen in den einzelnen Fraktionen kann man ersehen, dass die Fraktion A aus Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins und die Fraktion E aus Anhydrid des Glykokolls und Alanins bestehen, während die Fraktion B ein Gemisch von diesen beiden Anhydriden ist.

Die Fraktion D enthält über 90 Proz. Aminostickstoff und scheint vorwiegend eine Mischung von verschiedenen Aminosäuren darzustellen.

Die Fraktion F, welche eine starke Biuretreaktion zeigte, ist wohl ein Gemisch einer Reihe von Di- und Polypeptiden. In der Fraktion F<sub>1</sub> betrug der Prozentsatz des Aminostickstoffs zum Gesamtstickstoff 26.48 Proz. und entsprach demjenigen eines Tetrapeptids, während in der Fraktion F<sub>2</sub> der Aminostickstoff 47.19 Proz. des Gesamtstickstoffs ausmachte und sich wie der eines Dipeptids verhielt.

### C. Spaltung durch 0.2 n-Schwefelsäure.

Es wurden 60 g Seidenfibroin in gleicher Weise mittels 0.20

*n*-Schwefelsäure 10 Stunden bei 170° behandelt und die entstehenden Abbauprodukte gerade so verarbeitet, wie es in den vorangehenden Versuchen beschrieben ist. Bei der Behandlung mit der Säure gingen 83.45 Proz. des Stickstoffes in Lösung. Das ungelöst gebliebene Fibroin betrug 9.0 g. Das abiuret gewordene Hydrolysat wurde neutralisiert und unter verminderter Druck bei 40° eingeengt. Dabei schieden sich 1.90 g kristallinische Substanz aus (Fraktion A). Das Filtrat wurde dann mit Essigäther erschöpft. Der Essigätherauszug (Fraktion B) betrug 7.65 g und der in Wasser schwer lösliche Anteil desselben 0.49 g (Fraktion B<sub>1</sub>). Aus der Restlösung der Extraktion schieden sich dann 0.37 g Tyrosin aus (Fraktion C). Das Filtrat wurde dann nach Behandlung mit Tierkohle eingeengt und mit Alkohol versetzt. Der abgeschiedene Niederschlag wurde mehrmals mit Alkohol ausgezogen und getrocknet (Fraktion D). Er betrug 19.8 g und gab sehr schwache Pikrinsäure- und Millonsche Reaktion. Aus der alkoholischen Mutterlauge schied sich beim Einengen eine kristallinische Substanz aus, welche starke Carbonylreaktion zeigte (Fraktion E). Sie betrug 3.2 g. Den Rückstand stellte ein schwarzbraun gefärbter Sirup dar (Fraktion F). Die Stickstoffverteilung in diesen Fraktionen ist in der Tabelle VI zusammengestellt.

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass die Fraktionen der Abbauprodukte, welche bei der Spaltung mit 0.2 *n*-Schwefelsäure entstehen, fast dasselbe Verhalten in bezug auf ihren Gesamt- und Aminostickstoffgehalt zeigen, wie die der Spaltung mit verdünnterer Säure. Nur sind hier die freien Aminosäuren in grösserer Menge aufgetreten, und die Ausbeute an Anhydriden ist etwas geringer.

Im Anschluss an die Säurespaltung wurde nachstehend die Hydrolyse mit Alkali ausgeführt.

#### *D. Spaltung durch 0.05 und 0.025 n-Natronlauge.*

60 g Seidenfibroin, wurden mit der zehnfachen Menge 0.05 *n*-Natronlauge 10 Stunden bei 170° hydrolysiert. Der ungelöst gebliebene Rückstand betrug 6.8 g. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert und unter ver-

mindertem Druck auf ca. 80 ccm eingeengt. Da dabei keine merkliche Abscheidung einer festen Substanz erfolgte, wurde die sirupöse Lösung sofort in einem Flüssigkeitsextraktor mit Essigäther ausgezogen. Der Essigätherauszug betrug 7.4 g (Fraktion B). Er zeigte positive Millonsche und Pikrinsäurereaktion. Die Biuretreaktion fiel aber negativ aus. 3 g dieser Substanz wurden zur weiteren Fraktionierung in 100 ccm Wasser gelöst, mit Tierkohle behandelt, eingeengt und stehen gelassen. Es schied sich eine weisse Substanz aus, welche abgesaugt und getrocknet wurde (Fraktion B<sub>1</sub>). Sie betrug 0.515 g (auf 7.4 g berechnet 1.27 g). Die Mutterlauge wurde abgedampft, pulverisiert und getrocknet (Fraktion B<sub>2</sub>). Diese Fraktion betrug 2.27 g (auf 7.4 g berechnet 5.60 g). Aus der wässerigen Restlösung der Essigätherextraktion schied sich 0.39 g Tyrosin aus (Fraktion C). Die Restlösung wurde hierauf zur weiteren Fraktionierung eingeengt und die sirupöse Flüssigkeit mit der 9 fachen Menge Alkohol versetzt. Die dabei abgeschiedene Substanz wurde mehrmals mit 90%igem Alkohol gewaschen und getrocknet (Fraktion D). Sie betrug 19.5 g und zeigte die Biuret- und Millonsche Reaktion. Die Carbonylreaktion fiel sehr schwach aus. Aus der alkoholischen Lösung schied sich beim Einengen eine kristallinische Substanz aus, welche abgesaugt und getrocknet wurde (Fraktion E). Sie zeigte starke Carbonylreaktion. Das sirupöse Filtrat (Fraktion F) zeigte starke Biuretreaktion. Es enthielt 1.711 g Stickstoff. Derjenige Anteil dieser Fraktion, der mit Phosphorwolframsäure gefällt wurde (Fraktion F<sub>1</sub>), gab viel stärkere Biuretreaktion als der mit diesem Reagens nicht fällbare Anteil (Fraktion F<sub>2</sub>).

Auf gleiche Weise wurden 60 g Seidenfibroin mit 0.025 n-Natronlauge hydrolysiert und die Spaltprodukte in verschiedene Fraktionen zerlegt.

In allen diesen Fraktionen wurde der Gesamt- und Aminostickstoff bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle VI zusammengestellt.

Aus der Tabelle VI kann man ersehen, dass die bei der Spaltung sowohl mit 0.10, 0.175 und 0.20 n-Schwefelsäure, als auch mit 0.025 und 0.05 n-Natronlauge erhaltenen Fraktionen von

Abbauprodukten innerhalb jeder entsprechenden Fraktionen in grossen Zügen fast dieselben Verhältnisse in bezug auf ihren Amino- und Gesamtstickstoffgehalt zeigen, welches auch die Konzentration von Säure und Alkali sei, die zur Ausführung der Hydrolyse dienten. Auch das Verhalten der Biuret-, Carbonyl- und Millionschen Reaktionen ist mit einigen Ausnahmen fast identisch.

Nur traten Unterschiede insofern ein, als bei der Spaltung mittels stärkerer Säure die freien Aminosäuren (Fraktion D) in grösserer Menge auftraten, während bei der Spaltung mittels schwächerer Säure die Fraktion der Peptide (Fraktion F) starke Biuretreaktion ergab und sich als ein Gemisch von noch ziemlich hochmolekularen Polypeptiden erwies. Die Ausbeute an Anhydriden (Fraktion A, B und E) war bei der Spaltung mit 0.175 *n*-Säure am grössten und betrug ungefähr 40 Proz. des in Lösung gegangenen Fibroins. Die 10 stündige Spaltung durch 0.175 *n*-Säure ist mithin die günstigste Bedingung für die Bildung von Diketopiperazinen. Es wurde zuvor mitgeteilt (vgl. Fig. 2), dass bei der Spaltung des Seidenfibroins mit 0.175 *n*-Schwefelsäure der am Anfang steile Zuwachs an Aminogruppen sich mit der Zeit verminderte um nach 7½ bis 10 Stunden fast konstanten Wert zu zeigen. Gleichzeitig damit wurde die Biuretreaktion der Lösung negativ. Bei fortgesetztem Erhitzen schritt dann die Hydrolyse abermals fort. Es wurde mithin festgestellt, dass die Ausbeute an Anhydriden in demjenigen Fall am grössten ist, bei dem die Spaltung des Fibroins mit 0.175 *n*-Schwefelsäure eben bis zum abiureten Zustand durchgeführt wurde. Im Falle der Alkali-spaltung, bei der die Aminogruppe mit der Zeit schnelle und stetige Zunahme zeigte (vgl. Fig. 3), war die Ausbeute an Anhydriden geringer, während die Fraktion der Peptide (Fraktion F) in grösserer Menge auftrat und ziemlich starke Biuretreaktion ergab. Ferner wurde dabei eine grosse Menge von freien Aminosäuren nachgewiesen.

Jedenfalls traten als Abbauprodukte

1. Anhydrid des Glykokolls und Alanins,
2. Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins,
3. Freie Aminosäuren und

TABELLE

Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten des Seidenfibreins  
0.20 n-Schwefelsäure sowie 0.025  
a) Biuretreaktion, b) Carbonyl-

Fraktionen	Säure- und Alkalikonzentration In Lösung ge- gangener N	0.10-n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.175 n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
		73.50%		78.68%	
A	Beim Einengen abgeschie- dene Fraktion	1.7 g Gesamt-N 12.07% Amino-N 0	a) — b) ++ c) + + +	2.0 g Gesamt-N 12.59% Amino-N 0	b) ++ c) + + +
	Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins				
B	Essigätherauszug der Mutterlauge	11.5 g Gesamt-N 18.31% Amino-N 0.13% (0.68% des Ge- samtn-N)	a) — b) + + c) + +	12.0 g Gesamt-N 18.32% Amino-N 0	a) — b) + + c) + +
	Gemisch von Aminosäure- anhydriiden				
B <sub>1</sub>	In Wasser schwer löslicher Teil der Fraktion B	0.35 g	a) — b) + + c) + + +	1.93 g Gesamt-N 12.69% Amino-N 0	b) + + c) + + +
	Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins				
B <sub>2</sub>	In Wasser löslicher Teil der Fraktion B		b) + + c) +	Gesamt-N 19.05% Amino-N 0	b) + + c) + +
	Grössteils Anhydrid des Glykokolls und Alanins				
C	Aus der Restlösung der Essigätherextraktion abgeschiedene Fraktion Tyrosin	0.2 g	b) — c) + + +	0.3 g	b) — c) + + +
D	In Alkohol unlöslicher Teil der von Fraktion C abge- trennten Restlösung	5.5 g Gesamt-N 14.03% Amino-N 12.77% (91.01% des Ge- samtn-N)	a) — b) ± c) + +	11.0 g Gesamt-N 15.89% Amino-N 12.89% (81.11% des Ge- samtn-N)	a) — b) ± c) ±
	Grössteils Aminosäuren				
E	Aus dem Filtrat von D nach Austreiben des Alkohols all- mählig abgeschiedener Teil	1.7 g Gesamt-N 20.21% Amino-N 0	a) — b) + + c) +	4.1 g Gesamt-N 20.21% Amino-N 1.46% (7.20% des Ge- samtn-N)	a) — b) + + c) +
	Grössteils Anhydrid des Glykokolls und Alanins				
F	Von E abgetrennter siru- nöser Rückstand		a) + + b) ± c) + +	Gesamt-N 0.956 g Amino-N 0.316 g (33.10% des Ge- samtn-N)	a) ± b) + c) + +
	Grössteils Di- oder Polypeptide				
F <sub>1</sub>	Durch Phosphorwolfram- säure fällbarer Teil der Fraktion F	Gesamt-N 0.125 g Amino-N 0.033 g (26.48% des Ge- samtn-N)	a) + + b) — c) + +		
	Höhere Peptide				
F <sub>2</sub>	Durch Phosphorwolfram- säure nicht fällbarer Teil der Fraktion F	Gesamt-N 0.279 g Amino-N 0.131 g (47.19% des Ge- samtn-N)	a) + b) ± c) +		
	Niedere Peptide				
Büch- stand	Rückstand der Säure- und Alkalibehandlung				

## VI.

10 stündige Spaltung von 60 g Seidenfibroin mit 0.10, 0.175 und und 0.05 n-Natronlauge bei 170°.

reaktion, e) Millonsche Reaktion.

0.20 n-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.025 n-NaOH	0.05 n-NaOH
83.45%	77.03%	85.17%
1.9 g Gesamt-N 12.44% Amino-N 0	b)++ c)+++	
7.65 g Gesamt-N 17.53% Amino-N 0	b)++ c)++	8.2 g Gesamt-N 16.18% Amino-N 0 a)- b)++ c)++
0.49 g Gesamt-N 13.32% Amino-N 0	b)++ c)+++	1.25 g Gesamt-N 12.00% Amino-N 0 b)++ c)+++
Gesamt-N 18.71% Amino-N 0	b)++ c)++	6.65 g Gesamt-N 17.64% Amino-N 0 b)++ c)++
0.37 g		1.27 g Gesamt-N 12.28% Amino-N 0 b)++ c)+++
19.8 g Gesamt-N 15.28% Amino-N 12.32% (80.63% des Gesamt-N)	b)± c)±	11.3 g Gesamt-N 14.84% Amino-N 12.64% (85.21% des Gesamt-N) a)+ b)- c)+
3.2 g Gesamt-N 20.32% Amino-N 0.67% (3.29% des Gesamt-N)	b)++ c)+	2.3 g Gesamt-N 19.92% Amino-N 1.16% (7.62% des Gesamt-N) a)± b)++ c)+
a)- b)+ c)++		Gesamt-N 1.957 g Amino-N 0.597 g (30.47% des Gesamt-N) a)++ b)+ c)++
		Gesamt-N 0.963 g Amino-N 0.252 g (26.14% des Gesamt-N) a)++ b)± c)++
		Gesamt-N 0.689 g Amino-N 0.354 g (51.33% des Gesamt-N) a)++ b)± c)+
9.0 g		11.5 g Gesamt-N 17.94%
		6.8 g Gesamt-N 17.24%

#### 4. Di- und Polypeptiden

auf. In keinem Falle liessen sich Produkte nachweisen, in denen ausser offener Polypeptidbindung auch eine Anhydridgruppe vorhanden ist.

Auf Grund der hier dargelegten Befunde darf man wohl schliessen, dass, wie schon bei der Spaltung des Fibroins mit konzentrierter und 70%iger Schwefelsäure hervorgehoben wurde, die primären Produkte bei der Spaltung nach der Methode von Ssadikow und Zellinsky gleichfalls Polypeptide sind, die erst nachträglich teils in Diketopiperazine verwandelt, und teils auch zu Aminosäuren gespalten werden. Das Mengenverhältnis dieser Abbauprodukte ist abhängig von den Bedingungen bei der Aufspaltung, insbesondere von der zur Spaltung verwendeten Säure- und Alkalikonzentration. So haben die primär entstehenden Peptide bei der Spaltung mit Säure bestimmter Konzentration viel Neigung, sich in Anhydride zu verwandeln, während bei der Alkali-hydrolyse neben der Anhydridbildung eine merkliche Aufspaltung zu freien Aminosäuren vor sich geht. Das Verschwinden der Biuretreaktion wird dabei hervorgerufen einerseits durch die hydrolytische Spaltung der Polypeptide zu Aminosäuren, andererseits auch durch ihre Anhydrisierung zu Diketopiperazinen. Der Umstand, dass die Biuretreaktion bei der Säurehydrolyse trotz verhältnismässig geringer Zunahme des Aminostickstoffes frühzeitig verschwindet, ist auf diese Anhydridbildung zurückzuführen.

Es ist ferner höchst bemerkenswert, dass unter den Abbauprodukten, unabhängig von der zur Spaltung verwendeten Säure- und Alkalikonzentration, stets in mehr oder weniger grosser Ausbeute Diketopiperazine, die entweder nur aus Glykokoll und Alanin oder nur aus Glykokoll und Tyrosin bestehen, erhalten wurden. Aus diesem Umstand geht hervor, dass einerseits Glykokoll und Alanin, andererseits Glykokoll und Tyrosin sich im Molekül des Seidenfibroins in einer benachbarten Stellung befinden und miteinander verknüpft sind. Völlig im Einklang mit diesem Resultat stehen die Beobachtungen von E. Fischer, Abderhalden u. a. So berichten diese Autoren, dass bei der stufenweisen Aufspaltung des Seidenfibroins sich *d*-Alanyl-glycin, Glycyl-*d*-alanin, Anhydrid des

Glykokolls und Alanins, Glycyl-*l*-tyrosin, Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins, *d*-Alanyl-glycyl-*l*-tyrosin usw. isolieren lassen.

Um die sämtlichen bei der Spaltung des Fibroins entstehenden Produkte noch genauer und lückenlos kennen zu lernen wurde nachstehend die Verteilung des Glykokolls, Alanins und Tyrosins in den Fraktionen ermittelt, die bei der Aufspaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure und 0.05 n-Natronlauge erhalten wurden.

*E. Bestimmung der Verteilung der Aminosäuren in den Abbauprodukten des Seidenfibroins.*

Die Spaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure wurde abermals ausgeführt, da die Menge einiger Fraktionen, welche sich in dem vorangehenden Versuch erhalten liessen, nicht ausreichten, um sie hier zur Ermittlung der Verteilung der Aminosäuren zu verwenden. 60 g Seidenfibroin wurden mit 0.1 n-Schwefelsäure 10 Stunden lang aufgespalten. Das rückständige Fibroin wog nach dem Trocknen 16.0 g. Die Trennung der Abbauprodukte in einzelne Fraktionen erfolgte gerade so, wie es zuvor mitgeteilt wurde. Die beim Einengen der neutralisierten Lösung abgeschiedene Substanz (Fraktion A) betrug 2.10 g. Mit Phosphorwolframsäure ergab diese Fraktion keine Niederschläge. Sie besteht, wie aus dem Stickstoffgehalt ersichtlich, weitaus zum grössten Teil aus dem Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins (vgl. Tabelle VI). Aus 1 g Substanz liess sich nach der Hydrolyse mit 5 n-Schwefelsäure 0.721 g Tyrosin gewinnen, das 89.80 Proz. der Theorie entsprach.

Der Essigätherauszug der Mutterlauge betrug 11.55 g (Fraktion B). Zur Bestimmung einzelner Aminosäuren, welche in dieser Fraktion enthalten sind wurden 2 g Substanz mit 15 ccm 5 n-Schwefelsäure 16 Stunden rückfliessend gekocht. Die Schwefelsäure wurde quantitativ mit Baryt entfernt und der Barytniederschlag mehrmals mit Wasser ausgekochte. Das Filtrat und die Waschungen wurden dann bis zur Kristallisation des Tyrosins eingeeengt. Nach 24 stündigem Stehen wurde das Tyrosin abgesaugt und getrocknet. Das erhaltene Tyrosin betrug 0.134 g. Dies deutet auf 6.70 g Tyrosin in 100 g Essigätherauszug hin. Aus dem Filtrat des Tyrosins wurde das Glykokoll als Pikrat nach der

Methode von Levene und Van Slyke (1912) abgeschieden. Hierzu wurde es bis zur Trockenheit verdampft, unter Zusatz von 1.5-1.8 g Pikrinsäure (etwa 0.6 Grammolekül Pikrinsäure auf ein Grammolekül Glykokoll) in 7 ccm heissen Wassers gelöst und die Lösung dann im Eiswasser auf 0° abgekühlt. Dabei schieden sich Kristalle von Glykokollpikrat aus, welche nach einer Stunde abgesaugt, und zuerst zweimal mit eiskaltem Wasser und schliesslich mit 95%igem Alkohol gewaschen wurden. Das erhaltene Pikrat des Glykokolls betrug 1.776 g und entsprach 0.705 g Glykokoll. Dies deutet auf 35.25 g Glykokoll in 100 g Essigätherauszug hin. Das Pikrat schmolz bei 189.5° unter Gasentwicklung. Die Mutterlauge wurde hierauf mit Schwefelsäure angesäuert und die Pikrinsäure mit Äther ausgeschüttelt. Die Schwefelsäure wurde dann mit Baryt entfernt und das Filtrat bis zu Sirup eingeengt. Es wurde mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen gebracht und in einem aliquoten Teil wurde das Alanin nach der Methode von Kendal und Friedemann (1930) in Milchsäure überführt und die letztere nach der Methode von Friedemann und Kendal (1929) bestimmt. Da Gegenwart der Pikrinsäure keine Störung für die Bestimmung des Alanins aufwies, wurde in nachfolgenden Versuchen die Analyse ohne Entfernung der Pikrinsäure vorgenommen. Das Alanin betrug 0.728 g in 2 g des Auszugs, entsprechend 36.40 g für 100 g des letzteren.

Rechnet man die Aminostickstoffverteilung dieser drei Aminosäuren auf den Gesamtstickstoff um, so ergeben sich folgende Zahlen:

Tyrosin-N	2.83%
Glykokoll-N	35.86%
Alanin-N	31.22%

Es wurde früher nachgewiesen, dass diese Fraktion (Fraktion B) ein Gemisch von Glycin-alanin- und Glycin-tyrosinanhydrid sei. Damit stimmt das Mengenverhältnis der drei Aminosäuren überein.

Der Essigätherauszug gab Fällung mit Phosphorwolframsäure. Um diesen Anteil quantitativ zu ermitteln löste man 1 g Substanz in 30 ccm 5%iger Schwefelsäure und setzte von der konzentrierten Phosphorwolframsäurelösung so viel hinzu, bis eine filtrierte Probe

keine Fällung mit diesem Reagens mehr ergab. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abgesaugt und mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen. Es wurde dann in einer Reibschale mit heißgesättigter Barytlösung solange zersetzt als die Lösung deutlich alkalische Reaktion zeigte. Der entstandene Niederschlag von Phosphorwolframat wurde abfiltriert, einigermal in barytalkalischer Wasser suspendiert und abgesaugt. Von dem alkalischen Filtrat wurde der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure entfernt und die Flüssigkeit im Wasserbad eingeengt. Der Rückstand wurde hierauf in Wasser gelöst und in einem aliquoten Teil der Gesamtstickstoff bestimmt. Das Filtrat von der Phosphorwolframsäurefällung und deren Waschungen wurden mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen gebracht und in einem aliquoten Teil der Gesamtstickstoff bestimmt. Der mit Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff des Essigätherauszuges betrug 0.32 Proz. und der damit nicht fällbare Anteil 17.96 Proz.

Aus der wässrigen Restlösung der Essigätherextraktion schied sich bei mehrtägigem Stehen eine kristallinische Substanz aus, welche sich als Tyrosin erwies (Fraktion C). Sie wog 0.19 g.

Die Restlösung wurde zur weiteren Fraktionierung bis zu Sirup eingeengt und mit der 9 fachen Menge Alkohol versetzt. Die Fällung wurde einige Mal mit 90%igem Alkohol verrieben und abgenutscht. Sie wog 6.25 g (Fraktion D). Diese vorwiegend aus Aminosäuren bestehende Fraktion ergab mit Phosphorwolframsäure eine Fällung. Der mit diesem Reagens fällbare Stickstoff betrug 0.58 Proz. und der damit nicht fällbare Anteil 13.87 Proz. Nur in dem ersten fiel die Biuret- und Millonsche Reaktion positiv aus. Die Aminosäureverteilung in der Fraktion D wurde in der gleichen Weise wie oben dargelegt ermittelt. In dieser Fraktion überwog das Alanin an Menge das Glykokoll.

Die alkoholische Lösung lieferte beim Verdampfen einen sirupösen Rückstand, in dem sich nach Stehen über Nacht eine kristallinische Substanz abschied. Diese Fraktion (Fraktion E) wog 2.6 g. Die Verteilung der Aminosäuren wurde ermittelt. Tyrosin wurde dabei auf gravimetrischem Wege nicht nachgewiesen. Wie schon hervorgehoben, besteht diese Fraktion zum

grössten Teil aus Anhydrid des Glykokolls und Alanins. Allerdings zeigte die Verteilung der Aminosäuren, dass sie etwas mehr Glykokoll enthalten als Alanin. Der von der Fraktion E abgetrennte Sirup (Fraktion F) wurde durch Fällung mit Phosphorwolframsäure in zwei Teile getrennt. Der mit Phosphorwolframsäure fällbare Anteil (Fraktion F<sub>1</sub>) wurde eingeengt, der erhaltene Sirup in Methylalkohol gelöst und mit Äthylalkohol gefällt. Der weisse an der Luft sofort verharzende Niederschlag wurde abgesaugt und möglichst schnell in einen Vakuum-exsikkator eingebracht. Er betrug 0.30 g. Der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Anteil der Fraktion F (Fraktion F<sub>2</sub>) wurde gleichfalls in Methylalkohol gelöst und mit Äthylalkohol gefällt. Es resultierte ein weisses an der Luft unbeständiges Pulver. Es betrug 1.30 g. Diese aus Fraktion F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> erhaltenen pulverigen Substanzen wurden hydrolysiert und die Verteilung der Aminosäuren ermittelt. Die Fraktion F<sub>1</sub> zeigte Sakaguchi'sche Argininreaktion (Sakaguchi, 1925) und lieferte bei der Hydrolyse eine kleine Menge von Huminsubstanz.

Zur Kontrolle wurden das Seidenfibroin und dessen Rückstand bei der Säurebehandlung durch 5 n-Schwefelsäure hydrolysiert und unter den entstehenden Aminosäuren die Verteilung des Glykokolls, Alanins und Tyrosins in der oben genannten Weise ermittelt.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Aminosäureverteilung sind in den Tabellen VIIa, VIIb und VIIc zusammengestellt.

TABELLE VII a.  
Verteilung der Aminosäuren im Seidenfibroin.

Gesamt-N	17.62 %
Aminosäure Proz.	Tyrosin 8.60 % Glykokoll 30.92 % Alanin 25.26 %
Aminosäure-N zum Gesamt-N Proz.	Tyrosin-N 3.78 % Glykokoll 32.75 % Alanin 22.55 %

Die Abbauprodukte des Fibroins, welche zuvor bei der Spaltung mit 0.05 n-Natronlauge erhalten wurden, dienten dann

TABELLE VII b.

Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten des Seidenfibroins. 10 stündige Spaltung von 60 g Fibroin mit 0.10 n-Schweifelsäure bei 170°. In Lösung gegangener N betrug 74.48% (Amino-N zum Gesamt-N Proz. 34.87%).

Fraktionen	Ausbeute g	Gesamt- N Proz.	Amino- N Proz.	Verteilung der Aminosäuren			a) Biuretreaktion b) Carbonylreaktion c) Millionsche Reak- tion
				Amino- N zum Gesamt- N Proz.	Amino- säuren g in 100 g Substanz	Amino- säure-N zum Gesamt-N Proz.	
A Beim Einengen ab- geschiedene Fraktion	2.10	12.40	0	0	Tyrosin	72.10	44.90 a) -- b) ++ c) ++ +
B Essigätherauszug der Mutterlauge	11.55	18.35	0	0	Tyrosin Glykokoll Alanin	6.70 35.25 36.44	2.83 35.86 31.22 a) -- b) ++ c) ++
B <sub>1</sub> In Wasser schwer lösli- cher Teil der Fraktion B	0.35	12.92	0	0			
B <sub>2</sub> In Wasser löslicher Teil der Fraktion B							
C Aus der Restlösung der Essigätherextraktion abgeschiedene Fraktion	0.19	8.20					a) -- b) -- c) ++ +

D	In Alkohol unlöslicher Teil der von Fraktion C abgetrennten Restlösung	6.25	14.24	12.45	87.24	Tyrosin Glykokoll Alanin	1.80 25.51 43.83	0.98 a) + b) ± c) ++
E	Aus dem Filtrat von D nach Ausstreichen des Alkohols allmählig abgeschiedener Teil	2.60	19.31	0.63	3.27	Tyrosin Glykokoll Alanin	0 42.63 32.95	0 41.23 26.85
F	Von E abgetrennter sirupöser Rückstand				Gesamt-N 0.857 g Amino-N 0.254 g	29.66		a) ++ b) ± c) +
F <sub>1</sub>	Durch Phosphor-wolframsäure fällbarer Teil der Fraktion F				Gesamt-N 0.237 g Amino-N 0.053 g	23.54	Tyrosin Glykokoll Alanin	7.94 14.87 10.96
F <sub>2</sub>	Durch Phosphor-wolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion F				Gesamt-N 0.375 g Amino-N 0.156 g	42.38	Tyrosin Glykokoll Alanin	0.89 25.02 12.55
	Rückstand der Säure-behandlung	16.0	16.29				Tyrosin Glykokoll Alanin	4.47 26.79 22.18
								3.35 30.70 21.42

TABELLE VII e.  
Trennung der Fraktionen B, D und E durch Fällung mit  
Phosphorwolframsäure.

Faktionen	Gesamt-N Proz.	a) Biuretreaktion b) Carbonylreaktion c) Millonsche Reaktion	Durch PW G Z, fällbarer Proz.	a) Biuretreaktion b) Carbonylreaktion c) Millonsche Reaktion	Durch PW S nicht fällbare N Proz.	a) Biuretreaktion b) Carbonylreaktion c) Millonsche Reaktion
B	18.35	a) — b) ++ c) ++	0.32	a) — b) ± c) +	17.96	a) — b) + c) ++
D	14.24	a) + b) ± c) ++	0.58	a) + b) — c) +	13.87	a) — b) — c) —
E	19.31	a) — b) ++ c) +	0.15	a) + b) — c) +	17.50	a) — b) + c) ±

der einzelnen Fraktionen mit 5 n-Schwefelsäure wurde die Bestimmung der Aminosäuren in der schon erwähnten Weise ausgeführt. Die sirupösen Fraktionen  $F_1$  und  $F_2$  wurden nach der Bestimmung des Gesamtstickstoffes sofort mit Schwefelsäure bis zu 25 Proz. Gehalt versetzt und hydrolysiert. Bei der Fraktion  $F_1$  trat dabei eine verhältnismässig grosse Menge von Huminsubstanz auf. Da diese Fraktion recht starke Sakaguchi'sche Reaktion zeigte, wurde das Arginin nach der Methode von Sakaguchi-Weber (1930) bestimmt. Das Ergebnis ist in den Tabellen VIIIa und VIIIb zusammengestellt.

TABELLE VIII a.  
Verteilung der Aminosäuren im Seidenfibrin.

Gesamt-N	16.63 %
Aminosäure Proz.	Tyrosin 8.05 Glykokoll 30.39 Alanin 24.26
Aminosäure-N zum Gesamt-N Proz.	Tyrosin-N 3.74 Glykokoll-N 34.10 Alanin-N 22.95

TABELLE VIII b.  
 Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten des Seidenfibrins. 10 stündige Spaltung von 60 g  
 Fibrin mit 0.05 n-Natronlauge bei 170°. In Lösung gegangener N  
 betrug 85.17% (Amino-N zum Gesamt-N Proz. 47.72%).

Fraktionen	Ausbeute g	Gesamt-N Proz.	Amino-N Proz.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Verteilung der Aminosäuren		a) Biuretreaktion b) Carbonylreaktion c) Millonsche Reaktion
					Aminosäuren	Amino-säure-N zum Gesamt-N Proz.	
A	Beim Einengen abgeschiedene Fraktion						
B	Essigätherauszung der Mutterlauge	7.4	16.58	0	0	Tyrosin Glykokoll Alanin	17.05 19.60 28.94
B <sub>1</sub>	In Wasser schwer löslicher Teil der Fraktion B	1.27	12.28	0	0		
B <sub>2</sub>	In Wasser löslicher Teil der Fraktion B	5.60	18.49	0	0	Tyrosin Glykokoll Alanin	6.75 20.61 35.35
C	Aus der Restlösung der Essigätherextraktion abgeschiedene Fraktion	0.39	7.04				

D	In Alkohol unlöslicher Teil der von Fraktion C abgetrennten Restlösung	19.5	14.00	11.84	84.22	Tyrosin Glykokoll Alanin	0.21 25.09 21.13	0.12 33.44 23.74	a) + b) ± c) ++
E	Aus dem Filtrat von D nach Ausstreichen des Alkohols allmählich abgeschiedener Teil	2.5	20.06	1.47	7.36	Tyrosin Glykokoll Alanin	0 44.52 31.81	0 41.43 23.84	a) - b) ++ c) +
F	Von E abgetrennter sirupöser Rückstand			Gesamt-N Amino-N	1.711 g 0.578 g	33.79			a) ++ b) + c) ++
F <sub>1</sub>	Durch Phosphorwolframsäure fällbarer Teil der Fraktion F			Gesamt-N Amino-N	0.777 g 0.202 g	26.04	Tyrosin Glykokoll Alanin Arginin	4.61 13.71 12.30 0.46	a) +++ b) + c) ++
F <sub>2</sub>	Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil der Fraktion F			Gesamt-N Amino-N	0.722 g 0.405 g	56.10	Tyrosin Glykokoll Alanin	1.63 38.42 23.33	a) ++ b) ± c) +
	Rückstand der Alkalibehandlung						Tyrosin Glykokoll Alanin	10.20 28.23 28.09	4.55 30.56 25.64

Aus der Tabelle VIIb ersieht man, dass in dem Essigätherauszug eine etwas kleinere Menge von Glykokoll aufgefunden wurde als der des Tyrosins und Alanins equivalent ist. In der Fraktion B<sub>2</sub>, welche sich durch Abtrennung des in Wasser schwer löslichen Glycin-tyrosinanhydrids aus Fraktion B erhalten liess, waren das Tyrosin und Glykokoll vermindert, während das Alanin dement sprechend etwas zugenommen hatte. In der Fraktion E war dagegen etwas mehr Glykokoll zugegen, als dem Alanin equivalent ist. In der Fraktion der freien Aminosäuren (Fraktion D) überwog das Glykokoll der Menge nach der des Alanins.

Bei der Fraktion F<sub>1</sub> war ferner, wie aus der Tabelle ersichtlich, die Menge der nachgewiesenen Aminosäuren erheblich gering und zwar ungefähr um die Hälfte geringer als in den anderen Fraktionen. Dieser Umstand röhrt einerseits daher, dass in dieser mit Phosphorwolframsäure fällbaren Fraktion bei der Hydrolyse eine grosse Menge von Huminsubstanz auftrat, andererseits ist zu vermuten, dass hier irgendeine andere Aminosäure zugegen ist. Um diese Frage zu entscheiden wurde das Hydrolysat der Fraktion F<sub>1</sub> und zur Kontrolle auch das der Fraktion F<sub>2</sub>, aus denen das Tyrosin und Glykokoll schon entfernt wurden, folgendermassen aufgearbeitet. Die durch Pikrinsäure stark gefärbten Lösungen wurden mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther vollkommen frei von Pikrinsäure ausgeschüttelt. Die Schwefelsäure wurde mit Baryt entfernt und die Lösungen wurden abgedampft und getrocknet. An diesen Rückständen wurden die Elementaranalyse und die Bestimmung des Gesamt- und Aminostickstoffes ausgeführt.

### 1) Das Pulver aus Fraktion F<sub>1</sub>.

0.0935 g Substanz gaben 0.1451 g CO<sub>2</sub>, 0.0543 g H<sub>2</sub>O und 0.0061 g Asche.

Das sind 42.33% C, 6.50% H und 6.52% Asche.

Der Gesamtstickstoff betrug 13.12% und der Aminostickstoff 11.82% (90.16% des Gesamtstickstoffes).

Auf aschefreie Substanz berechnet:

45.28% C    6.95% H    14.04% N    33.73% O

### 2) Das Pulver aus Fraktion F<sub>2</sub>.

0.0684 g Substanz gaben 0.0969 g CO<sub>2</sub>, 0.0418 g H<sub>2</sub>O und 0.0040 g Asche.

Das sind 38.63% C, 6.84% H und 5.85% Asche.

Der Gesamtstickstoff betrug 14.20% und der Aminostickstoff 13.96% (98.33% des Gesamtstickstoffes).

Auf aschefreie Substanz berechnet:

41.03% C	7.26% H	15.09% N	36.63% O
----------	---------	----------	----------

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N (Alanin):

40.42% C	7.92% H	15.73% N	35.93% O
----------	---------	----------	----------

Man kann ersehen, dass die elementare Zusammensetzung des aus der Fraktion F<sub>2</sub> erhaltenen Pulvers ungefähr einer solchen des Alanins entsprach, während das Pulver aus F<sub>1</sub> höheren Kohlenstoff- und niederen Sauerstoffgehalt zeigte. Dies deutet auf die Gegenwart der kohlenstoffreicherem Aminosäure in der Fraktion F<sub>1</sub> hin.

Um einen Überblick über die in den Tabellen VII und VIII angegebenen Verteilung der Aminosäuren zu gestatten, wurde nachstehend die auf 100 g Seidenfibroin berechnete Menge von einzelnen Aminosäuren zusammengestellt (Tabelle IX).

## VI. BEHANDLUNG DES FIBROINRÜCKSTANDES MIT SÄURE UND ALKALI.

Bei der Spaltung des Seidenfibroins mit verdünnter Schwefelsäure und Natronlauge unter Druck blieb stets ein Teil des Fibroins als bräunliche Bruchstücke ungelöst zurück. Wie schon oben angegeben, ist die Zusammensetzung dieses Rückstandes an Tyrosin, Glykokoll und Alanin nur wenig verschieden von der des originalen Fibroins. Um die Frage zu entscheiden ob dieser Rückstand des Fibroins andere Abbauprodukte liefere als das ursprüngliche Fibroin, wurden zunächst 30 g Rückstand mit der 10 fachen Menge 0.1 n-Schwefelsäure auf 170° 10 Stunden lang erhitzt und die entstehenden Spaltprodukte in verschiedene Fraktionen getrennt. Die Stickstoffverteilung in diesen Fraktionen wurde ermittelt und in der Tabelle X zusammengestellt.

Aus dieser Tabelle ersieht man, dass die Aufspaltung des Fibroinrückstandes mit 0.1 n-Schwefelsäure annähernd dieselben Abbauprodukte liefert, wie bei der Spaltung des ursprünglichen

TABELLE IX.  
Aminosäureverteilung in einzelnen Fraktionen auf 100 g Seidenfibrin berechnet. a) Spaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure.

Amino-säuren	a) Seiden-fibrin	b) Unge-löster Anteil	Fraktionen					(Prozent zum gelösten Anteil)						
			A	B	C	D	E							
		c) Gelös-ter Anteil (a-b)												
Tyrosin	8.60	2.07	6.53	2.52	1.29	0.32	0.19	0	0.27	0.005	3.91 (58.3)	0.28 (4.3)	0.51 (7.8)	4.60 (70.0)
Glyko-koll	30.92	7.15	23.77	1.04	6.76	0	2.03	1.85	0.50	1.33	9.65 (40.7)	1.83 (7.7)	2.03 (8.5)	13.51 (56.6)
Alanin	25.26	5.66	19.60	0	7.00	0	4.13	1.43	0.37	1.03	8.43 (43.0)	1.40 (7.1)	4.13 (21.1)	13.96 (71.3)

b) Spaltung mit 0.05 n-Natronlauge.

Amino-säuren	a) Seiden-fibrin	b) Unge-löster Anteil	Fraktionen					(Prozent zum gelösten Anteil)						
			A	B	C	D	E							
		c) Gelös-ter Anteil (a-b)												
Tyrosin	8.05	1.16	6.89		2.11	0.65	0.07	0	0.77	0.25	2.11 (30.6)	1.02 (14.8)	0.72 (10.4)	3.85 (55.9)
Glyko-koll	30.39	3.20	27.19		2.42	0	8.30	1.86	0.95	2.48	4.28 (15.8)	3.43 (12.6)	8.30 (30.5)	16.01 (58.8)
Alanin	24.26	3.18	21.08		3.57	0	6.85	1.33	0.98	1.88	4.90 (22.4)	2.86 (13.1)	6.85 (31.4)	14.61 (66.8)

TABELLE X.

Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten von 30 g Rückstand I.  
10 stündige Spaltung mit 0.10 n-Schwefelsäure.  
(In Lösung gegangener N betrug 50.97%).

	Faktionen	Aus-beute g	Gesamt- N Proz.	Amino- N Proz.	Amino- N zum Gesamt- N Proz.	a) Biuretreak- tion b) Carbonyl- reaktion c) Millionsche Reaktion
A	Beim Einengen abgeschiedene Fraktion	0.75				
B	Essigätherauszug der Mutterlauge	3.35	18.28	0	0	a) - b) ++ c) +
C	Aus der Restlösung der Essigätherex- traktion abge- schiedene Fraktion	0.15				
D	In Alkohol unlös- licher Teil der von Fraktion C abge- trennten Restlösung	2.7	15.22	12.11	79.58	a) - b) ± c) +
E	Aus dem Filtrat von D nach Austreiben des Alkohols allmäh- lig abgeschiedener Teil	0.57	19.63	0.03	0.15	a) - b) ++ c) ±
F	Von E abgetrennter sirupöser Rückstand	Gesamt-N 0.443 g Amino-N 0.086 g		19.46		a) ++ b) ± c) ++
Rück- stand	Rückstand der zweiten Säure- behandlung	15.6	15.81			

Fibroins. Der Rückstand, welcher nach 10 stündiger Hydrolyse des Rückstands I erhalten wurde, ist Rückstand II genannt. 2 g Rückstand II wurden mit 5 n-Schwefelsäure vollständig hydrolysiert und nach dem schon genannten Verfahren die Verteilung der Aminosäuren bestimmt. Es ergaben sich folgende Zahlen.

7.25%	Tyrosin
23.68%	Glykokoll
20.17%	Alanin

13.5 g des Rückstandes II wurden wieder mit der 10 fachen Menge 0.1 n-Schwefelsäure 10 Stunden lang behandelt. Der dabei zurückgebliebene Anteil (Rückstand III) betrug 7.1 g.

Die Bestimmung der Verteilung der Aminosäuren in dem Rückstand III ergeb:

3.79%	Tyrosin
19.60%	Glykokoll
17.20%	Alanin

In der Tabelle XI sind der Stickstoffgehalt und die Verteilung der Aminosäuren in den Rückständen I, II, III und in dem Seidenfibroin zusammengestellt.

TABELLE XI.

Verteilung der Aminosäuren in den Rückständen der Säurebehandlung  
(0.10 n-Schwefelsäure).

	Gesamt-N Proz.	Verteilung der Aminosäuren			Bei der Säurebe- handlung in Lösung ge- gangener Stickstoff Proz.
		Amino- säuren	g in 100 g Substanz	Amino- säure-N	
Seidenfibroin	17.62	Tyrosin Glykokoll Alanin	8.60 30.92 25.26	3.78 32.75 22.55	74.48
Rückstand I	16.29	Tyrosin Glykokoll Alanin	7.47 26.79 22.18	3.35 30.70 21.42	50.97
Rückstand II	15.81	Tyrosin Glykokoll Alanin	7.25 23.68 20.17	3.55 27.96 20.06	43.55
Rückstand III	13.44	Tyrosin Glykokoll Alanin	3.79 19.60 17.20	2.18 27.22 20.13	

Aus der Tabelle geht hervor:

1. Bei fortgesetztem Behandeln mit Säuren wird der Stickstoffgehalt der Rückstände, immer niedriger. So betrug er bei dem dritten Rückstand 13.44 Proz.
2. Die Rückstände wiesen immer stärkeren Widerstand gegen Säure auf als das ursprüngliche Seidenfibroin.
3. In bezug auf die Verteilung der einzelnen Aminosäuren in den Rückständen kann folgendes gesagt werden (vgl. Aminosäure-N zum Gesamt-N Proz.). Mit der Abnahme des Gesamtstickstoffs in den Rückständen zeigte sich eine beträchtliche Verminderung des Tyrosins. Das Glykokoll und Alanin wiesen dagegen nur eine geringe Abnahme auf. Unter den drei Aminosäuren scheint das Tyrosin verhältnismässig frühzeitig aus dem Molekül des Fibroins abgespalten zu werden, während das Glykokoll und Alanin langsam folgen.
4. Die Verminderung des Stickstoffs in den Rückständen, trotz Abspaltung des stickstoffarmen Tyrosins, legt die Vermutung nahe, dass in dem durch Säure schwer angreifbaren Anteil des Fibroinmoleküls noch andere stickstoffarme Bausteine vorhanden sind.

Um die unter 4 angedeuteten Verhältnisse klar zu stellen, wurde das bei der Ermittlung der Aminosäureverteilung von Rückstand III erhaltene Hydrolysat, von dem das Tyrosin und Glykokollpikrat abfiltriert wurde, nach Entfernung der Pikrinsäure mit Schwefelsäure und Äther und nach Beseitigung der Schwefelsäure mit Baryt bis zur Trockenheit verdampft und die Elementaranalyse der so erhaltenen pulverigen Substanz ausgeführt.

0.0653 g Substanz gaben 0.0879 g CO<sub>2</sub>, 0.0392 g H<sub>2</sub>O und 0.0030 g Asche.

Das sind 36.72% C, 6.73% H und 4.60% Asche.

Der Gesamtstickstoff betrug 14.58% und der Aminostickstoff 14.57% (99.93% des Gesamtstickstoffes).

Auf aschefreie Substanz berechnet:

36.89% C 6.76% H 14.65% N 41.70% O

Für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N (Alanin) berechnet:

40.42% C    7.92% H    15.73% N    35.93% O  
 Für  $C_3H_7O_3N$  (Serin) berechnet:  
 34.27% C    6.72% H    13.33% N    45.68% O

Die Schwefelbleireaktion und die Reaktion von Molisch fielen negativ aus.

Diese Substanz wies mithin einen niedrigeren Kohlenstoff- und einen höheren Sauerstoffgehalt auf als das Alanin, dagegen höheren Kohlenstoff- und niedrigeren Sauerstoffgehalt als das Serin. Dieser Umstand deutet wohl darauf hin, dass in den der Säurewirkung am meisten widerstehenden Anteil des Seidenfibroins (Rückstand III) das Serin zugegen ist.

In den Rückständen der 0.025 und 0.05 n-Alkalibehandlung wurde gleichfalls die Verteilung der Aminosäuren ermittelt. Der Rückstand der 0.05 n-Alkalispaltung (Rückstand I) wurde abermals der Einwirkung von Alkali ausgesetzt und in dem so erhaltenen Rückstand (Rückstand II) die Aminosäureverteilung ermittelt. Die Resultate sind in der Tabelle XII zusammengestellt.

TABELLE XII.

Verteilung der Aminosäuren in den Rückständen der Alkalibehandlung.  
 a. Behandlung mit 0.05 n-Natronlauge.

	Gesamt-N Proz.	Verteilung der Aminosäuren			Bei der Alkalibe- handlung in Lösung gegangener N
		Amino- säuren	g in 100 g Substanz	Amino- säure-N zum Gesamt- N Proz.	
Seiden- fibroin	16.63	Tyrosin Glykokoll Alanin	8.05 30.39 24.26	3.74 34.10 22.95	85.17
Rückstand I	17.24	Tyrosin Glykokoll Alanin	10.20 28.23 28.09	4.55 30.56 25.64	44.32
Rückstand II	15.70	Tyrosin Glykokoll Alanin	8.00 27.16 22.59	3.94 32.22 22.63	

## b. Behandlung mit 0.025 n-Natronlauge.

	Gesamt-N Proz.	Verteilung der Aminosäuren			Bei der Alkalibehandlung in Lösung gegangener N
		Amino- säuren	g in 100 g Substanz	Amino- säure-N zum Gesamt- N Proz.	
Rückstand I	17.94	Tyrosin Glykokoll Alanin	8.25 31.00 24.89	3.56 32.26 21.78	

Entgegen den Verhältnissen bei der Säurespaltung treten in den Rückständen der Alkalispaltung nur geringfügige Unterschiede in bezug auf die Verteilung der drei Aminosäuren auf.

Um die Frage zu entscheiden, ob hier wie bei der Säurebehandlung der Rückstände in dem der Spaltung widerstehenden Anteil das Serin zugen ist, wurde das Hydrolysat des Rückstandes der 0.025 n-Alkalibehandlung nach der Entfernung des Glykokolls und Tyrosins getrocknet und die Elementaranalyse der erhaltenen pulverigen Substanz ausgeführt.

0.0596 g Substanz gaben 0.0824 g CO<sub>2</sub>, 0.0371 g H<sub>2</sub>O und 0.0027 g Asche.

Das sind 37.74% C, 6.97% H und 4.60% Asche.

Der Gesamtstickstoff betrug 13.93% und der Aminostickstoff 13.71% (98.47% des Gesamtstickstoffes).

Auf aschefreie Substanz berechnet:

39.57% C 7.31% H 14.60% N 38.52% O

Für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N (Alanin) berechnet:

40.42% C 7.92% H 15.73% N 35.93% O

Die Schwefelbleireaktion fiel negativ aus.

Aus dem Resultat der Analyse ergab sich, dass diese Substanz der Hauptmenge nach aus Alanin besteht.

Als wesentlichstes Ergebnis der Spaltung der Rückstände mit Säure und Alkali zeigte es sich, dass bei der Einwirkung verdünnter Säure unter Druck der tyrosinhaltige Komplex eine frühzeitige Aufspaltung erfuhr und dagegen das Serin in dem der

Säure widerstehenden Anteil zurückblieb, und dass bei der alkalischen Reaktion die Aufspaltung einzelner Bausteine aus dem Fibroinmoleköl mit dem Fortschritt der Hydrolyse gleichmässig erfolgte.

#### VII. GLYCERINBEHANDLUNG DES SEIDENFIBROINS NACH VORANGEGANGENER SPALTUNG MITTELS VERDÜNNTER SCHWEFELSÄURE.

Wie zuvor dargelegt worden war (Kap. II), wurde bei der Glycerinbehandlung des Seidenfibroins nach dem Verfahren von Shibata unter den Abbauprodukten Anhydrid des Glykokolls und Alanins nachgewiesen. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung der Glycerinbehandlung gegen das Eiweisshydrolysat studiert. Die Glycerinbehandlung wurde dabei einerseits in der üblichen Weise in einem Rundkolben im Ölbad durchgeführt, indem man das Wasser aus dem Reaktionsgemisch entweichen liess, andererseits unter Verwendung eines Druckgefäßes im Autokloven und zwar bei Gegenwart einer kleinen Menge Wassers vorgenommen.

30 g Seidenfibrein wurden zuerst mit 0.1 n-Schwefelsäure 10 Stunden auf 170° erhitzt. Das ungelöst gebliebene Fibroin wurde abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. Es wurde dann zu zähem Sirup im Vakuum in einem Rundkolben eingeengt und unter Versetzung mit einer Menge wasserfreiem Glycerin, welches der 10 fachen zur durch Säurebehandlung in Lösung gegengene Fibroinmenge entspricht, im Ölbad auf 170° erhitzt. Als bald began die Lösung, unter Entweichen des Wasserdampfes, lebhaft zu sieden. Nach etwa zwei Stunden wurde die Glycerinlösung völlig frei von Wasser. Im Interval von je 2½ Stunden wurde eine Probe entnommen und der Gesamt- und Aminostickstoff bestimmt (Tabelle XIIIa).

Neben diesem Versuch wurde das mit 0.175 n-Schwefelsäure 5 Stunden gespaltene Produkt in derselben Weise mit Glycerin behandelt und die zeitliche Veränderung des Aminostickstoffes verfolgt (Tabelle XIIIb).

Die Biuretreaktion ist in beiden Fällen schon nach 2½ Stunden verschwunden. Im Laufe der Zeit verminderte sich die freie Aminogruppe in hohem Masse. Diese Abnahme des Aminostick-

TABELLE XIII a.

Glycerinbehandlung des Seidenfibroins nach 10 stündiger Vorbehandlung mit 0.10 n-Schwefelsäure. Bei der Säurespaltung in Lösung gegangener N betrug 75.6%.

Erhitzungsduer	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Verminderter Amino-N Proz.	Biuretreaktion
Vor dem Versuch	35.14	0	+
2h 30'	19.54	44.4	-
5h	9.25	73.6	-
7h 30'	5.33	84.8	-

TABELLE XIII b.

Glycerinbehandlung des Seidenfibroins nach 5 stündiger Vorbehandlung mit 0.175 n-Schwefelsäure. Bei der Säurespaltung in Lösung gegangener N betrug 80.5%.

Erhitzungsduer	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Verminderter Amino-N Proz.	Biuretreaktion
Vor dem Versuch	39.08	0	+
2h 30'	25.41	34.9	-
5h	17.89	54.2	-
7h 30'	13.97	61.2	-

stoffes beruht wahrscheinlich einerseits auf der Ringbildung der Di- und Polypeptiden, andererseits auf der Kondensation der Aminosäuren miteinander oder mit Diketopiperazinen. Besonders auffallend trat diese Erscheinung in demjenigen Fall auf, bei dem das Fibroin mit 0.10 n-Schwefelsäure vorbehandelt wurde, und die Hydrolyse weniger tief gegangen war, mithin eine grössere Menge von Di- und Polypeptiden und freie Aminosäuren in geringerer Menge zugegen war (vgl. Fig. 4). Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, dass bei der Glycerinbehandlung die Anhydrisierung der Peptiden leichter stattfindet als die der Aminosäuren.

Neben diesen Versuchen wurde ein anderer in ähnlicher Weise, aber unter Zusatz der 5 fachen Menge Glycerins ausgeführt.

Beim Erhitzen mit der 5 fachen Menge Glycerin verschwand die Biuretreaktion ebenfalls nach  $2\frac{1}{2}$  Stunden. Der Aminostick-

Fig. 4.

Glycerinbehandlung der Abbauprodukte des Seidenfibroins (1)  
Erhitzen im Ölbad.

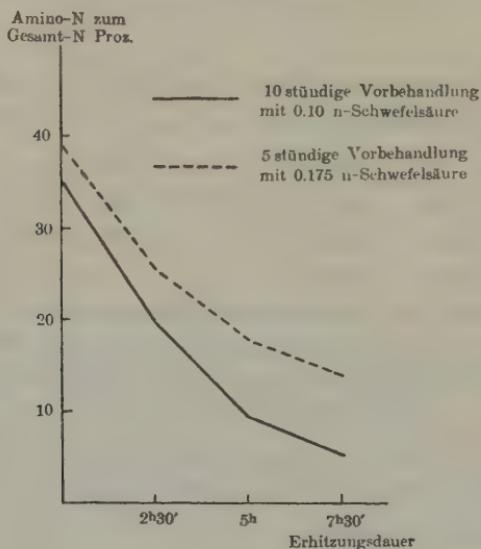


TABELLE XIV.

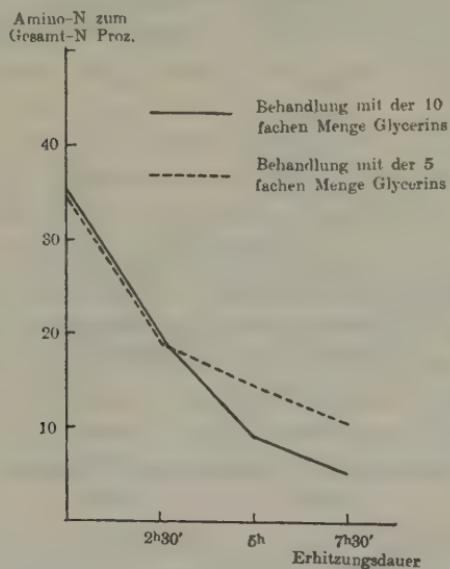
Glycerinbehandlung des Seidenfibroins nach 10 stündiger Vorbehandlung mit 0.1 n-Schwefelsäure. Der bei der Säurespaltung in Lösung gegangene Stickstoff betrug 76.0%.

Erhitzungsdauer	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Verminderter Amino-N Proz.	Biuretreaktion
Vor dem Versuch	34.79	0	+
2h 30'	19.06	45.21	-
5h	14.47	58.39	-
7h 30'	10.64	69.40	-

stoff verminderte sich in den ersten  $2\frac{1}{2}$  Stunden annähernd ebenso stark wie zuvor, während in den folgenden Stunden der Grad der Anhydrisierung etwas geringer war (vgl. Fig. 5).

Anschliessend an diese Versuche wurde die Glycerinbehandlung unter Anwendung des Druckgefäßes im Autoklaven vor-

Fig. 5.  
Glycerinbehandlung der Abbauprodukte des Seidenfibroins (2)  
Erhitzen im Ölbad.



genommen, indem man das Entweichen des Wassers aus dem Reaktionsgemisch vermied.

60 g Seidenfibroin wurden wie schon erwähnt mit 0.1 n-Schwefelsäure vorbehandelt. Dabei gingen 74.30 Proz. Stickstoff in Lösung. Die Lösung wurde nach der Neutralisation mit Alkali unter verminderter Druck auf 90 g eingeengt. Das so erhaltene Produkt enthielt ca. 45 g gelöstes Fibroin und 45 g Wasser. 30 und 60 g von diesem Sirup wurden in zwei Druckgefässe eingebracht und mit je 150 g wasserfreiem Glycerin versetzt. Das erste Gefäß enthielt also 15 g Fibroin, 15 g Wasser und 150 g Glycerin, mithin die 10 fache Menge Glycerin sowohl des Fibroins als auch des Wassers. Das zweite Gefäß enthielt nur die 5 fache Menge Glycerin des Fibroins und des Wassers. Beide wurden im Autoklaven auf 170° erhitzt. Es wurden auf diese Weise die Veränderungen des Aminostickstoffs und der Biuretreaktion zeitlich verfolgt.

Die Ergebnisse zeigt die folgende Tabelle.

TABELLE XV a.

Behandlung mit der 10 fachen Menge Glycerin (Erhitzen im Autoklaven).

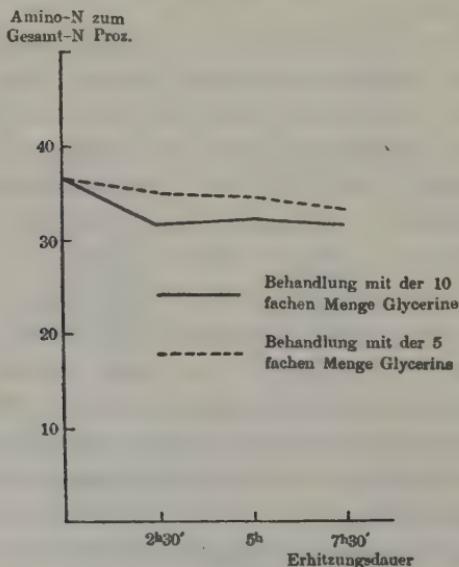
Erhitzungsdauer	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Verminderter Amino-N Proz.	Biuretreaktion
Vor dem Versuch	36.52	0	+
2h 30'	31.74	13.08	+
5h	32.18	11.90	+
7h 30'	31.55	13.60	+

TABELLE XV b.

Behandlung mit der 5 fachen Menge Glycerin (Erhitzen im Autoklaven).

Erhitzungsdauer	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Verminderter Amino-N Proz.	Biuretreaktion
Vor dem Versuch	36.52	0	+
2h 30'	34.93	4.12	+
5h	34.72	4.92	+
7h 30'	33.24	8.99	+

Fig. 6.

Glycerinbehandlung der Abbauprodukte des Seidenfibriöns (3)  
Erhitzen im Autoklaven.

Aus den Tabellen XVa, XVb, und Figur 6 ersieht man, dass die anhydrisierende Wirkung des Glycerins sich in erheblichem Masse vermindert wenn das Glycerin 10 bis 20 Proz. Wasser enthält. Die Biuretreaktion fiel nach  $7\frac{1}{2}$  stündigem Erhitzen noch positiv aus und die Lösungen färbten sich nicht so stark wie bei den vorigen Versuchen.

Während bei der Glycerinbehandlung der Abbauprodukte des Seidenfibroins in möglichst wasserfreiem Zustande eine beträchtliche Verminderung der freien Aminogruppen stattfand, ging die Abnahme derselben nur spurenweise vor sich, wenn das Erhitzen im Autoklaven vorgenommen wurde, und die Verflüchtigung des Wassers vermieden wurde. Man hat hier allen Grund anzunehmen, dass die Diketopiperazine, welche bei der Glycerinbehandlung der Proteine erhalten wurden, nicht im Proteinmolekül präformiert sind, wie Shibata meint, sondern wenigstens zum grössten Teil sekundär entstandene Kunstprodukte darstellen.

#### VIII. ISOLIERUNG DER ABBAUPRODUKTE, DIE BEI DER SUCCESSIVEN BEHANDLUNG MIT VERDÜNNTER SCHWEFELSÄURE UND GLYCERIN ENTSTANDEN SIND.

Da beim Erhitzen der zuvor mit 0.10 n-Schwefelsäure behandelten Produkte im Autoklaven keine tiefgreifende Veränderung erfolgte, wurde die Isolierung der Abbauprodukte nur in denjenigen Fällen ausgeführt, bei denen das Erhitzen im Ölbad vorgenommen wurde.

##### A. Mit der 10 fachen Menge Glycerin ausgeführter Versuch.

Von dem Reaktionsgemisch (30 g Fibroin entsprechend) wurde das Glycerin unter verminderter Durek (13–14 mm Hg) abdestilliert. Der möglichst vom Glycerin befreite Rückstand wurde noch heiss ausgegossen, mit Kaolin vermischt und mit einer Reihe von organischen Lösungsmitteln nacheinander ausgezogen.

Der Essigätherauszug: Nach dem Verjagen des Lösungsmittels verblieb ein sirupöser Rückstand, in dem gelbliche Körnchen kristallinischer Substanz in reichlicher Menge auftraten. Die Menge des kristallinischen Produktes nahm mit der Zeit zu, und der

Sirup erstarrte schliesslich zu einer gallertartigen Masse. Er wurde dann scharf abgesaugt und die möglichst vom Glycerin befreite Masse auf Ton abgepresst und getrocknet. Die Ausbeute betrug 5.0 g. Sie zeigte positive Millonsche und Carbonylreaktion. Nach dreimaliger Umkristallisation aus Alkohol unter Zusatz von Tierkohle zeigte das Produkt keine Millonsche Reaktion mehr. Es schmolz bei 238° unter Zersetzung und erwies sich als ein Anhydrid des Glykokolls und Alanins.

Der Chloroformauszug hinterliess beim Abdampfen nur eine verschwindend kleine Menge fester Substanz.

Beim Abdampfen des stark gefärbten alkoholischen Auszuges liess sich eine schwarze schmierige Masse erhalten, welche trotz aller Mühe nicht zu kristallinischer Substanz aufgearbeitet werden konnte.

Ebenso wurde von dem Eisessigauszug eine kleine Menge schwarzer Schmiere erhalten, welche gleichfalls sehr schwer zu reinigen war.

Zuletzt wurde die Extraktion mit Wasser vorgenommen. Der Auszug bildete aber nur eine geringe Menge von schwarz braunem Sirup.

#### *B. Mit der 5 fachen Menge Glycerin vorgenommener Versuch.*

Das Glycerin wurde im Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit Kaolin vermischt und mit verschiedenen Lösungsmitteln ausgezogen.

Die aus dem Essigätherauszug erhaltene Substanz betrug 4,4 g. Die Millonsche Reaktion war positiv. Nach dreimaliger Umkristallisation aus Alkohol verschwand die Millonsche Reaktion. Die Substanz schmolz bei 238° und erwies sich als Glycinalaninanhydrid.

Die äthyl- und methylalkoholischen Auszüge hinterliessen beim Abdampfen schwarze schwer zu reinigende Schmiere.

Die Produkte, welche Tyrosin in Bindung enthalten, liessen sich in diesen Versuchen nicht isolieren, da die Fraktionen, welche starke Millonsche Reaktion zeigten, stets schwarze schwer zu reinigende schmierige Produkte darstellten. Wahrscheinlich gingen

die tyrosinhaltigen Anteile der Spaltungsprodukte, wie früher hervorgehoben, in melaninartige Substanzen über. In den vorliegenden Versuchen war die Ausbeute des Alanin-glyeinanhydrids viel grösser als in demjenigen Fall, bei dem das Fibroin direkt mit Glycerin behandelt wurde.

#### IX. ZUSAMMENFASSUNG.

Die Resultate meiner Untersuchung lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

1. Dass Seidenfibroin wurde nach der Methode von Shibata mit Glycerin behandelt. Aus den Abbauprodukten wurde das Glycerin im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit verschiedenen Lösungsmitteln nacheinander ausgezogen. Aus dem Essigätherauszug wurde auf diese Weise ein Anhydrid des Glykokolls und Alanins isoliert. Die tyrosinhaltigen äthyl- und methylalkoholischen Auszüge stellten dagegen melaninartige Schmieren dar, aus denen sich einheitliche Substanzen nicht erhalten liessen.

2. Während sich bei der Spaltung des Fibroins mit konzentrierter Schwefelsäure unter Kälteanwendung im Laufe mehrerer Wochen kein merklicher Zuwachs an freien Aminogruppen beobachten liess, ging die Hydrolyse ungleich viel tiefer bei der Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure. Wenn das Wasser der letzteren teilweise durch Glycerin ersetzt wurde, ging die Hydrolyse etwas langsamer vor sich. Die Spaltung des Fibroins durch Schwefelsäure fand also nur bei Gegenwart einer bestimmten Menge Wassers statt.

3. Die partielle Spaltung des Seidenfibroins wurde bei 170° nach dem Prinzip von Ssadikow und Zellinsky unter Verwendung verdünnter Schwefelsäure und Natronlauge wechselnder Konzentration ausgeführt und der Verlauf der Hydrolyse zeitlich verfolgt. Bei der Spaltung mit 0.15–0.175 n-Schwefelsäure gestaltete sich der Verlauf der Hydrolyse derart, dass der zunächst auffällige Zuwachs an freien Aminogruppen sich mit der Zeit verminderte, um nach 7½ Stunden ein Zustand zu erreichen, in dem der Aminostickstoff einige Stunden lang einen konstanten Wert (42–43% des Gesamtstickstoffs) zeigte und gleichzeitig die

Biuretreaktion verschwand. Bei der Spaltung mit 0.175 n-Säure nahm der Aminostickstoff durch das Fortsetzen der Hydrolyse abermals zu. Bei Anwendung von 0.1 n-Säure ging die Spaltung in geringerem Masse vor sich und die Biuretreaktion blieb nach 12½ Stunden noch bestehen. Mit 0.2 n-Schwefelsäure wurde dagegen das Fibroin alsbald in hohem Grade aufgespalten und nach dem Verschwinden der Biuretreaktion fand der Aminostickstoffzuwachs noch weiter statt. Bei der Spaltung mit Alkali schritt die Zunahme des Aminostickstoffes immer fort in jeder Alkalikonzentration, und die Biuretreaktion blieb viel länger bestehen als bei der Säurespaltung. Ferner erfolgte die Hydrolyse in alkalischer Lösung viel schneller als in saurer.

4. Das Seidenfibroin wurde mit 0.175 n-Schwefelsäure bei 170° 10 Stunden hydrolysiert, und zwar bis sich eben der abiurete Zustand erreichen liess und der Aminostickstoffwert konstanten Verlauf zeigte. Die entstehenden Abbauprodukte wurden in eine Reihe von Fraktionen getrennt. Beim Einengen von neutralisiertem Hydrolysat schied sich eine kristallinische Substanz ab, welche sich als Anhydrid des Glykokolls und Tyrosins erwies. Aus dem Essigätherauszug der Mutterlauge wurde dann ein Anhydrid des Glykokolls und Alanins und ein solches des Glykokolls und Tyrosins erhalten. Aus der Restlösung der Extraktion schied sich ferner eine kleine Menge Tyrosin ab. Der in Alkohol unlösliche Anteil der Mutterlauge stellte der Hauptmenge nach eine Mischung von freien Aminosäuren dar. Beim Einengen des in Alkohol löslichen Teiles der Mutterlauge schied sich dann eine Fraktion ab, welche Anhydrid des Glykokolls und Alanins enthielt. Der rückständige Sirup besteht sehr wahrscheinlich aus verschiedenen Di-, eventuell Polypeptiden.

Auf gleiche Weise wurde das Fibroin mit 0.10 und 0.20 n-Schwefelsäure sowie mit 0.025 und 0.05 n-Natronlauge hydrolysiert und die Abbauprodukte in verschiedene Fraktionen zerlegt.

In allen Fraktionen wurden der Amino- und Gesamtstickstoff bestimmt, um den Vergleich der Zusammensetzung einzelner Fraktionen zu gestatten. Die Fraktionen wiesen dabei innerhalb jeder entsprechenden Fraktionen fast dieselben Verhältnisse in bezug auf

ihre chemische Zusammensetzung auf, welches auch die Konzentration der zur Ausführung der Hydrolyse dienenden Säure oder Natronlauge war. Nur traten Unterschiede insofern ein, als bei der Spaltung mit jeweils stärkerer Säure grössere Mengen von freien Aminosäuren auftraten, während die Spaltprodukte mit jeweils verdünnterer Säuren noch die Biuretreaktion zeigenden ziemlich hochmolekularen Polypeptide enthielten.

Ferner war die Ausbeute an Anhydriden bei der Spaltung mit stärkerer Säure geringer. Die Menge der Anhydride trat im Falle der Alkalihydrolyse gleichfalls zurück, um denen der Aminosäuren und Peptide Platz zu machen.

Es zeigt sich sowohl aus diesen quantitativen Versuchen wie aus dem Ergebnis der Spaltung des Fibroins durch 70%ige Schwefelsäure, dass die primären Produkte der Spaltung der Proteine Polypeptide sind, die teils erst sekundär sich in Diketopiperazine verwandeln oder teilweise zu Aminosäuren hydrolysiert werden. Als weiteres Ergebnis ist zu erwähnen, dass als Abbauprodukte durch Säure und Alkali verschiedener Konzentration nur Anhydrid des Glykoholls und Alanins und ein solches des Glykokolls und Tyrosins, aber nie ein solches des Alanins und Tyrosins auftreten. Dies besagt, dass im Molekül des Fibroins einerseits Glykokoll und Alanin, andererseits Glykokoll und Tyrosin eine benachbarte Stellung einnehmen.

Um die bei der Spaltung entstehenden Abbauprodukte noch eingehend und lückenlos kennen zu lernen, wurde ferner die Verteilung des Glykokolls, Alanins und Tyrosins in sämtlichen Abbaufaktionen ermittelt, welche bei der Spaltung mit 0.1 n-Schwefelsäure und 0.05 n-Natronlauge erhalten wurden.

5. Der Rückstand, der bei der Spaltung mit 0.1 n-Säure unter Druck zurückblieb, wurde abermals in gleicher Weise mit Säure behandelt. Dabei entstanden fast dieselben Spaltprodukte wie oben dargelegt. Der Stickstoffgehalt des Rückstandes wurde etwas niedriger. Nach nochmaligem Behandeln mit Säure verminderte sich der Stickstoffgehalt des Rückstandes in beträchtlichem Masse. Die Aminosäureverteilung in den Rückständen zeigte, dass das Tyrosin sich mit der Abnahme des Gesamtstickstoffs erheblich

verminderte, während in dem der Säurewirkung am meisten widerstehenden Anteil des Fibroins das Serin zugegen zu sein scheint. In den Rückständen der sukzessiven Alkalibehandlung wurden solche Abweichungen in der Aminosäureverteilung nicht festgestellt.

6. Das mit verdünnten Säuren bei 170° erhaltene Hydrolysat des Seidenfibroins wurde bis zu Sirup eingeengt und mit Glycerin bei 170° behandelt. Das Erhitzten wurde einerseits im Ölbad durchgeführt, indem man das im Reaktionsgemisch enthaltene Wasser freiwillig entweichen liess, andererseits im Autoklaven unter Vermeidung der Verflüchtigung des Wassers. In den ersten Fällen zeigte sich eine beträchtliche Abnahme der freien Aminogruppen unter Bildung von Anhydriden. Besonders auffallend trat dies in denjenigen Fällen auf, bei denen das Fibroin mit 0.1 n-Säure vorbehandelt und die Hydrolyse weniger tief gegangen war. Die Biuretreaktion verschwand schon nach 2½ Stunden. Dagegen trat nur eine unbedeutende Verminderung der Aminogruppen in denjenigen Fällen auf, bei denen die Glycerinbehandlung im Autoklaven bei Gegenwart von Wasser vorgenommen wurde. Die Biuretreaktion blieb nach 7½ Stunden noch bestehen. Bei Gegenwart einer kleinen Menge Wassers blieb also die anhydrisierende Wirkung des Glycerins aus. Es ist mithin anzunehmen, dass die Diketopiperazine, die sich durch Glycerinbehandlung der Proteine isolieren liessen, grösstenteils im Eiweissmolekül nicht vorgebildet sind, sondern in der Hauptsache sekundär entstandene Kunstprodukte darstellen.

Aus den, auf diese Weise mit Glycerin im Ölbad unter freiem Entweichen des Wassers behandelten Produkten, liess sich Anhydrid des Glykokolls und Alanins in verhältnismässig guter Ausbeute gewinnen. Die tyrosinhaltigen Fraktionen waren dabei sehr schwer zu reinigen.

#### SCHLUSS.

Die Proteine erfahren die Aufspaltung nur zuerst unter einer Hydrolyse bei Gegenwart einer genügenden Menge Wassers, indem ihre langen Polypeptidketten zu einfacheren Peptiden zerlegt

werden. Die auf diese Weise entstehenden Peptiden wandeln sich dann einerseits durch Anhydrisierung in Diketopiperazine um, andererseits werden sie durch weitere Hydrolyse zu freien Aminosäuren gespalten. Das Mengenverhältnis der Peptiden, Anhydriden und Aminosäuren ist verschieden je nach der Bedingung der Aufspaltung und hängt vorwiegend von der verwendeten Säure- und Alkalikonzentration ab. Das Verschwinden der Biuretreaktion wird dabei herbeigeführt nicht nur durch die Aufspaltung der Polypeptiden sondern auch durch ihre Anhydrisierung zu Diketopiperazinen.

Nach dem Resultat meiner Untersuchung ist anzunehmen, dass die Proteine in der Hauptsache aus säureamidartig verknüpften Aminosäuren zusammengesetzt sind, wie es sich früher E. Fischer vorstellte. Demgegenüber scheinen die Diketopiperazine, wenn sie auch im proteinmolekül präformiert enthalten sind, nur einen kleinen Bruchteil desselben auszumachen.

Zum Schluss möchte ich nicht zu sagen verfehlen, dass ich Herrn Prof. Kakiuchi zu herzlichem Dank verpflichtet bin, für seine freundlichen Ratschläge bei dieser Arbeit.

#### LITERATUR.

- Abderhalden (1909): Ztschr. f. physiol. Chem., **62**, 315.
- Abderhalden (1909): Ztschr. f. physiol. Chem., **63**, 401.
- Abderhalden (1910): Ztschr. f. physiol. Chem., **65**, 417.
- Abderhalden (1911): Ztschr. f. physiol. Chem., **72**, 1.
- Abderhalden und Inoue (1912): Ztschr. f. physiol. Chem., **80**, 198.
- Abderhalden und Komm (1924): Ztschr. f. physiol. Chem., **134**, 121.
- Abderhalden und Komm (1924): Ztschr. f. physiol. Chem., **136**, 134.
- Abderhalden und Komm (1924): Ztschr. f. physiol. Chem., **139**, 147.
- Abderhalden und Schwab (1924): Ztschr. f. physiol. Chem., **139**, 169.
- Abderhalden und Schwab (1925): Ztschr. f. physiol. Chem., **148**, 254.
- Abderhalden und Suwa (1910): Ztschr. f. physiol. Chem., **66**, 13.
- Brigl (1923): Ber. d. deutsch. chem. Ges., **56**, 1887.
- Brill (1923): Ann. d. Chem., **434**, 204.
- Fischer, E. (1906): Untersuch. üb. Aminosäuren, Polypeptiden u. Proteine, **1**, 80.
- Fischer, E. und Abderhalden (1906): Ber. d. deutsch. chem. Ges., **39**, 752.

- Fischer, E. und Abderhalden (1906): Ber. d. deutsch. chem. Ges., **39**, 2315.  
Fischer, E. und Abderhalden (1907): Ber. d. deutsch. chem. Ges., **40**, 3544.  
Fischer, E. und Skita (1901): Ztschr. f. physiol. Chem., **33**, 177.  
Fischer, E. und Skita (1902): Ztschr. f. physiol. Chem., **35**, 221.  
Friedemann and Kendal (1922): Journ. of Biol. Chem., **82**, 23.  
Gawrilow, Stachejewa, Titowa und Ewergetowa (1927): Biochem. Ztschr., **182**, 26.  
Herzog (1924): Ztschr. f. physiol. Chem., **141**, 158.  
Herzog und Janke (1920): Ber. d. deutsch. Chem. Ges., **53**, 2162.  
Herzog und Kobel (1924): Ztschr. f. physiol. Chem., **134**, 299.  
Kendal and Friedemann (1930): Journ. of inf. Dis., **47**, 171.  
Levene and Van Slyke (1912): Journ. of Biol. Chem., **12**, 292.  
Linderström-Lang (1928): Ztschr. f. physiol. Chem., **173**, 32.  
Sakaguchi (1925): Journ. of Biochem., **6**, 25.  
Sasaki (1921): Biochem. Ztschr., **114**, 63.  
Shibata (1925): Act. phytochim., **2**, 39.  
Siegfried (1906): Ber. d. deutsch. chem. Ges., **39**, 397.  
Ssadikow und Zellinsky (1923): Biochem. Ztschr., **136**, 241.  
Ssadikow und Zellinsky (1924): Biochem. Ztschr., **147**, 30.  
Weber (1930): Journ. of Biol. Chem., **86**, 217.

## THE RATE OF LIBERATION OF AMINO ACIDS AND AMMONIA IN TRYPTIC HYDROLYSIS.\*

BY

TETUO TOMIYAMA AND SHINOBU SHIGEMATSU.

(*From the Imperial Fisheries Institute.*)

(Received for publication, March 15, 1934)

It is well known that a certain amount of ammonia is always liberated in addition to amino acids in the course of trypic hydrolysis of protein, and it is presumed that its liberation is due to the action of a certain special enzyme contained in the trypsin (Hunter, 1924).

The question whether the ammonia is liberated from the amide or whether it originated in the amino acids is not yet determined, but while the amino acids produced by digestion are absorbed and utilized, the ammonia being the last product in the process of metabolism, any nutritive value in it is inconceivable. For this reason, the velocity and the quantity of nitrogen liberation in these forms in the course of digestion of protein are considered to be factors in determining its nutritive value.

The authors have made the following studies on the proteins of such important feeding-stuffs as sardine, silk-worm pupa, and soy bean. According to Vonk's recent studies (1927, 1929) on the kind and the nature of the digestive enzymes of fish, they are not very different from the digestive enzymes of land animals. Therefore, we have studied first the digestion by trypsin purchased in the market.

### METHOD.

1. *Substrates:* The materials used for the present experiment were the same kinds of protein as was stated in the first re-

\* Chemical studies of the Protein of Feeding-stuffs. III

I: Bull. Soc. Scient. Fisheries, 2, 258, 1934

II: ibid., 2, 287, 1934

port, namely, the protein of silk-worm pupa, sardine flesh, and soy bean.

2. *Buffer solution:* The preliminary experiment was carried out in order to keep the pH of the reaction mixture constant.  $M/10$ - and  $M/5$ -boric acid buffer solutions (pH 8.6), to which were added both substrate and the enzyme together with some tricresol, were incubated for three days at 38°C. In every case, it was observed that the pH of reaction mixture was changed to pH lower than 8.0. But if the mixed solution of equal quantities of  $M/5$  boric acid buffer solution and 1 M NaHCO<sub>3</sub> was used, there was no change in its pH value for several days; therefore this solution was adopted for the experiment.

3. *Enzymes:* In a preliminary experiment, making the trypsin of Kahlbaum and of Grüber act on casein at pH 8.6 and 38°C for 20 hours, their activities were compared and it was found that the former activity was far greater than the latter one. Hence, the Kahlbaum trypsin was chosen for the experiment.

	Kahlbaum-trypsin (+)	Kahlbaum-trypsin (-)	Grüber-trypsin (+)	Grüber-trypsin (-)
Per cent of hydrolysis	30.6	20.3	14.5	14.7

(+) indicates the addition of enterokinase.

(-) indicates no addition of enterokinase.

4. *Preparation of enterokinase:* The mucous membrane of the upper part (two meters or less) of the pig's small intestine was taken and dehydrated by acetone. Then it was treated with ether, and the powder thus obtained was extracted with  $M/10$  boric acid buffer solution (pH 8.6) at room temperature for one hour; the insoluble part was removed by centrifuging, and the soluble part was used as the kinase. Then, the quantity of the enterokinase required for fully activating the Kahlbaum trypsin used in this experiment, was determined beforehand as is shown in the following preliminary experiment.

The following reaction components except casein were mixed and the trypsin was thus activated by keeping it at 30°C for one hour; then 2% casein solution (pH 8.6) was added and well mixed. One hour later, in order to stop the reaction as well as to remove

the protein, sulphosalicylic acid was added and filtered. The amino-N in the filtrate was estimated by Van Slyke method. The results were as follows:

M/10 Boric acid buffer solution pH 8.6 (cc.)	H <sub>2</sub> O (cc.)	Trypsin (cc.)	Enterokinase (cc.)	2% Casein (cc.)	Amino-N × 2 (cc.)
5	4.0	2	1.0(0.02 g)	5	2.7
"	3.5	"	1.5(0.03 g)	5	2.8
"	2.5	"	2.5(0.05 g)	5	3.0
"	0.0	"	5.0(0.10 g)	5	3.0
"	5.0	"	0	5	2.5
"	10.0	"	0	0	1.1
"	5.0	"	5	0	1.1

It is clearly seen from the above results that 0.1 gm of the trypsin used was completely activated by the solution equivalent to 0.05 g of the kinase powder, hence the trypsin solution activated in the foregoing way was used throughout the experiment.

5. *Digestion experiment:* The reaction system was made up as in the following combination. For each of the proteins, the protein digest (main experiment) and the protein control were set in several flasks, using one flask for each digestion period, and at the same time the enzyme control, which was common to all kinds of protein, was also made.

- I. The main experiment    1 g of sample protein + 20 cc. buffer solution + 2 cc. activated trypsin.
- II. Protein control                1 g of sample protein + 20 cc. buffer solution + 2 cc. H<sub>2</sub>O
- III. Enzyme control                ——————  
    20 cc. buffer solution + 2 cc. activated trypsin.

To each of these flasks, tricresol (Kahlbaum) up to 0.5% was added and they were left in a thermostat at 38°C. After 2, 24, 73, and 163 hours, reaction was stopped by neutralizing with hydrochloric acid and then adding sulphosalicylic acid. The amino-N in the filtrate was determined by Van Slyke method, and ammonia-N by the aeration method (Van Slyke and Cullen,

1914). In such a digestion condition as they were left in at 38°C and pH 8.6, it is supposed that the ammonia formed might escape more or less and therefore, in the preliminary experiment, the ammonia set free in the gaseous phase of the flask was caught continuously during the digestion, and it was ascertained that the quantity of it was so small that it was within the limit of experimental error, and so in the digestion experiment the flasks were simply left stoppered tight.

#### EXPERIMENTAL RESULTS.

The quantities of amino-N and ammonia-N liberated by digestion only from each protein (subtracting both of the protein- and the enzymescontrol from the value of the corresponding main experiment), expressed as per cent of the total nitrogen of each protein respectively, are shown in Fig. 1~3, and these same quantities expressed as per cent of the amino-N and the ammonia-N yielded upon the complete hydrolysis of the corresponding protein

Fig. 1.

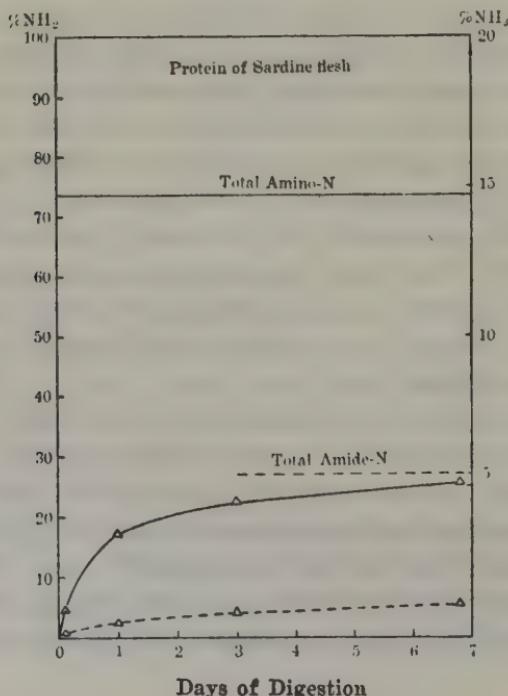
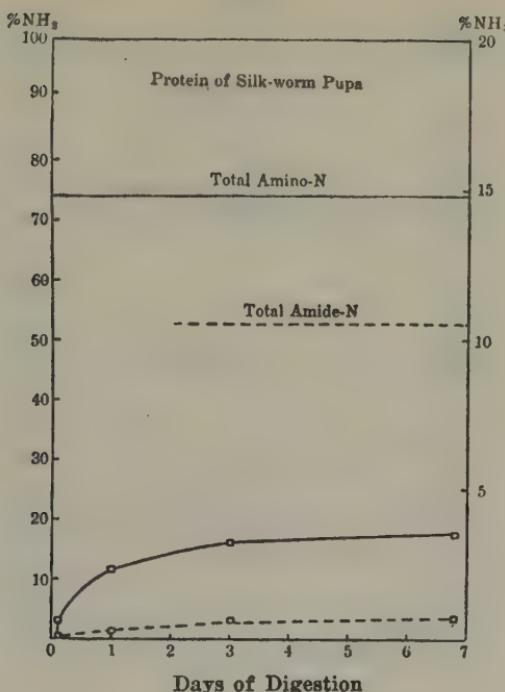


Fig. 2.



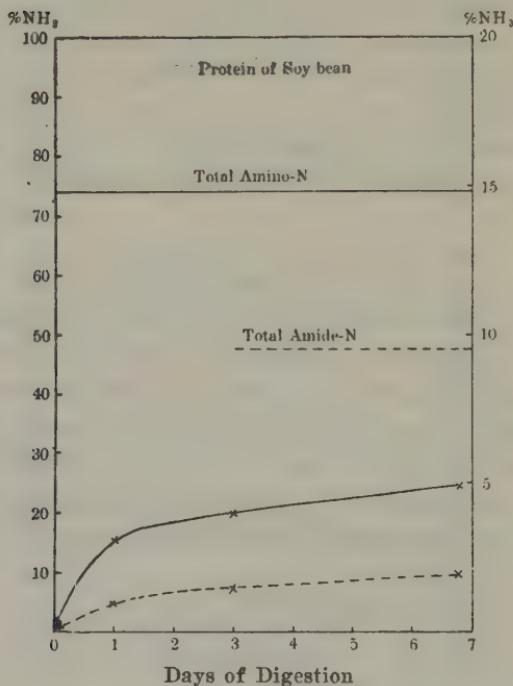
by boiling with 20% HCl are given in Fig. 4.

When the process of tryptic digestion is treated as monomolecular reaction, the results are as shown in table 1 and illustrated in Fig. 5.

As is general in the case of enzyme reaction, the velocity constant of liberation of amino-N and ammonia-N from each protein by trypsin showed markedly greater value at the first stage and decreased as time elapsed.

Comparing the three kinds of protein of feeding-stuffs, the velocity of liberation of amino-N is greatest in sardine flesh, and smaller in the cases of soy bean and silk-worm pupa respectively. Under the reacting condition above mentioned, the degree of hydrolysis attained after 7 days' digestion, expressed as per cent of complete hydrolysis brought about by boiling with 20% HCl, was 35 for sardine flesh, 33 for soy bean, and 24 for silk-worm pupa.

Fig. 3.

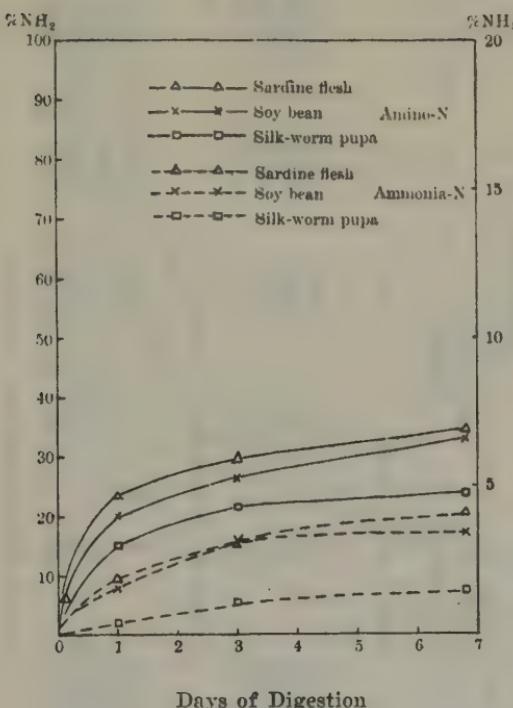


In the former two, the increasing tendencies of digestion even after 7 days were observed, while in silk-worm pupa the reaction seemed almost stopped.

In all three cases, the velocity constant of the liberation of ammonia was smaller than that of the amino acid. In comparing the three kinds of protein, there was not much difference between the proteins of sardine flesh and soy bean, while the velocity constant for the protein of silk-worm pupa was far smaller than that of the former two. In regard to the quantity of ammonia yielded by the equal quantities of the three kinds of protein, the soy bean yielded the largest quantity, while the sardine flesh yielded the smallest (Fig. 1~3); this is fully accounted for by the law of mass action.

Although three proteins were digested by the trypsin in the foregoing experiment, a certain amount of erepsin must have been

Fig. 4.



contained in the preparation of enterokinase, and hence it should be taken into account that the latter might also have participated more or less in the digestive action.

#### SUMMARY.

1. The proteins of sardine flesh, silk-worm pupa, and soy bean were hydrolyzed at 38°C and pH 8.6 by the Kahlbaum's trypsin completely activated by enterokinase, and both the amino-N and the ammonia-N liberated during digestion were determined after 2, 24, 73, and 163 hours, and the velocities of liberation of these two forms of nitrogen were compared.

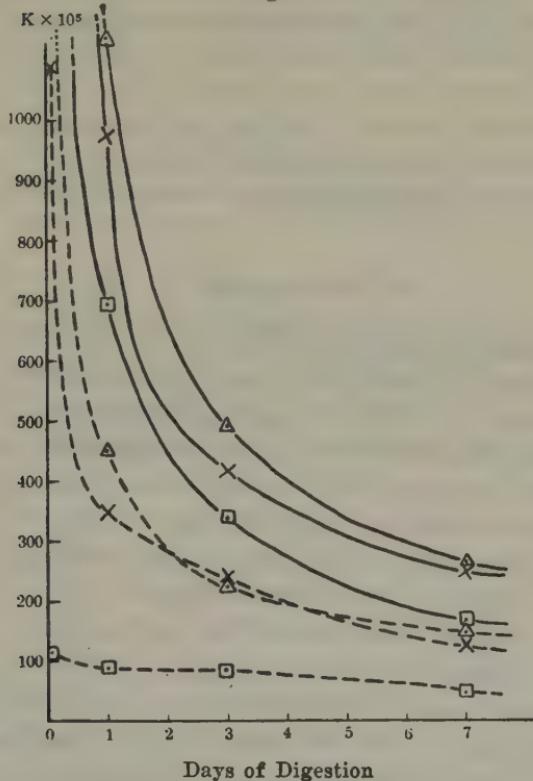
2. The reactions of liberation of amino-N and ammonia-N were not conformable to the monomolecular reaction. In the initial stage of the digestion, the velocity constant treated as a monomole-

TABLE I.

$x$  = Quantity of amino-N or ammonia-N liberated.  
 $a$  = Quantity of amino-N or ammonia-N yielded upon complete hydrolysis by 20 per cent of HCl.

$t$ (hours)	AMINO-N				AMMONIA-N			
	Amino-N (mg.)	$x$	$a-x$	$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$	$t$ (hours)	Ammonia-N $x$ (mg.)	$a-x$	$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
0	0.604	—	—	—	94.806	Protein of soy bean	$a = 13.718$	—
2	4.290	3.686	91.120	0.01982	—	0.321	0.299	0.01098
24	20.335	19.731	75.075	0.00972	24	0.720	1.094	0.00348
73	25.473	24.869	69.937	0.00416	73	2.462	2.141	0.00237
163	32.173	31.569	63.237	0.00248	163	2.832	2.511	0.00124
					$a = 110.771$	Protein of sardine flesh	$a = 8.227$	—
0	0.544	—	—	—	—	—	—	—
2	7.753	7.209	103.562	0.03366	—	0.198	0.288	0.01781
24	27.011	26.467	84.304	0.01138	24	0.486	0.842	0.00450
73	33.866	33.333	77.438	0.00490	73	1.040	1.430	0.00222
163	39.263	38.719	72.052	0.00264	163	1.932	1.743	0.00146
					$a = 97.225$	Protein of silk-worm pupa	$a = 13.506$	—
0	0.895	—	—	—	—	—	—	—
2	4.769	3.984	93.241	0.02087	—	0	0.321	0.003
24	15.670	14.885	82.340	0.00692	2	0.324	0.606	0.285
73	22.057	21.272	75.953	0.00338	73	1.122	1.801	0.801
163	23.951	23.166	74.059	0.00167	163	1.305	1.207	0.984

Fig. 5.



cular reaction showed markedly greater values and as the digestion progressed their values became gradually smaller. In the case of the proteins of sardine flesh and of soy bean, digestion continued more or less even after seven days, while, in the case of the protein of silk-worm pupa, equilibrium was already noticed after three days' digestion.

3. The quantity of amino-N liberated, expressed as to per cent, both of total nitrogen and of total amino-N, was greatest in the protein of sardine flesh, and it was far less in the proteins of soy bean and silkworm pupa. The quantity of the ammonia-N liberated, expressed as per cent of total nitrogen of each of the proteins, was greatest in the protein of soy bean, and there was hardly any difference between that of silkworm pupa and sardine

flesh, but if it is expressed as per cent of the amide-N contained in the protein, it is practically the same in the proteins of soy bean and of sardine flesh, while in the protein of the silk-worm pupa it was much smaller than in those of the former two.

In conclusion we wish to express our sincere thanks to Prof. Y. Okuda of the Kyushu Imperial University for his valuable guidance and helpful suggestions.

#### REFERENCES.

- Hunter, A. and Smith, R. G. (1924-5) : J. Biol. Chem., **62**, 649.  
Luck, J. M. (1924) : Biochem. J., **18**, 679.  
Vonk jun., H. J. (1927) : Z. wiss. Biol., **5**, 445.  
" (1929) : Z. vergl. Physiol., **9**, 685.  
Van Slyke and Cullen (1914) : J. Biol. Chem., **19**, 221.

## KONSTITUTION DER POLYPEPTIDE UND PROTEOLYTISCHE FERMENTE.

VON

JUJIRO MATSUI.

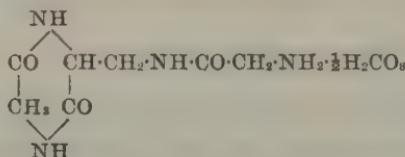
(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie  
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 16. März 1934)

Das Vorkommen von Peptidanhydriden im Eiweissmolekül wurde durch Untersuchungen von verschiedenen Seiten wahrscheinlich gemacht aber nicht gesichert, weil Befunde fehlen, dass die synthetischen Diketopiperazine der Hydrolyse durch die Proteasen unterliegen können. Der Verfasser hat in der vorigen Mitteilung (1933) über das Glycylaminomalonsäureanhydrid berichtet und wollte die tryptische Spaltbarkeit dieses Diketopiperazins der Anwesenheit der freien Carboxylgruppe an der Seitenkette zuschreiben. Die Annahme des Verfassers wurde weiter von Ishiyama (1933) bestätigt. Ishiyama hat verschiedene Diketopiperazine synthetisiert, die Asparaginsäure oder Glutaminsäure enthielten, und ihr Verhalten gegen die Protease untersucht. Nun waren die Dipeptidanhydride mit der unbesetzten Carboxylgruppe in der Seitenkette spezifisch durch das Trypsin hydrolysierbar, z. B. Glycylasparaginsäureanhydrid und Asparagylasparaginsäure-anhydrid, dagegen das Glycylglutaminanhydrid nicht, weil das Seitenkettencarboxyl amidiert ist. Das Glycinanhydrid widersteht bekanntlich der Wirkung der Proteasen. Somit wurde eine Regel für die fermentative Aufschliessung des Diketopiperazinrings gegeben. Eine andere Regel wurde von Abderhalden und Schwab (1932) ermittelt, indem diese Autoren fanden, dass Leucyl-[glycyltyrosinanhydrid], Leucyl-[glycylleucinanhydrid] und Leucyl-[glycylserinanhydrid] proteolytisch an ihren Anhydridringen gespalten wurden. Der Diketopiperazinring wird also durch das Aminoacylieren in seiner Iminogruppe gelockert und fermentativ aufschliessbar. Man merkt aber bei den Sub-

straten von Abderhalden die dissoziierbare Aminogruppe an der Seitenkette. Es ist also interessant, das fermentative Verhalten des die Diaminosäure enthaltenden Peptidanhydrids zu untersuchen.

Der Verfasser hat das Glycyl-[glycyldiaminopropionsäure-anhydrid] als Carbonat dargestellt.



Das Verhalten dieses Tripeptidanhydrids war wie folgt: Durch das Trypsin und das mit der Enterokinase aktivierte Trypsin wurde die Substanz hydrolysiert, aber nicht durch das Pepsin oder Erepsin. Es ist noch nicht bestimmt, ob die Zunahme des titrierbaren Carboxyls durch die Aufschliessung des Diketopiperazinrings oder durch die Abspaltung des Glycinrests in der Seitenkette verursacht wurde. Der Versuch soll also zukünftig mit dem Glycyldiaminopropionsäureanhydrid wiederholt werden. Jedenfalls ist für die Hydrolysierbarkeit der CO-NH-Bindung durch die tryptischen Fermente die Existenz der freien Carboxylgruppe nicht unbedingt nötig, und bei den speziellen Fällen, wie den Diketopiperazinen, genügt dafür die Anwesenheit der dissoziierbaren basischen Gruppe in der Seitenkette. Damit steht vielleicht die Spaltung des Leucyl-[glycyltyrosinanhydrids] durch das Trypsin im Einklang.

Wenn man weiter das Ergebnis von Miyanoki (1931) in Erwägung zieht, ist ein interessanter Zusammenhang der chemischen Konstitution mit der fermentativen Spaltbarkeit ersichtlich. Die Monoglycyl-diaminopropionsäure ist ausschliesslich durch das Erepsin hydrolysierbar. Die  $\alpha$ ,  $\beta$ -Diglycyl-diaminopropionsäure wird aber sowohl durch das Erepsin als auch durch das Trypsin gespalten. Das Anhydrid dieses Tripeptids ist nun nur durch das Trypsin spaltbar. Im gleichen Sinne verhalten sich Glycylasparaginsäure und Glycylglutaminsäure. Diese beiden Dipeptide

sind spezifisch durch das Erepsin spaltbar. Ihr Anhydrid gehört aber, wie von Ishiyama angegeben, dem spezifischen Substrat der tryptischen Fermente an.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

##### *I. Darstellung des Glycyl-* *[glycyl-diaminopropionsäureanhydrids].*

a,  $\beta$ -Dichloracetyl-diaminopropionsäure wurde nach der Angabe von Miyanoki (1931) durch Chloracetylieren des Diaminopropionsäurebromhydrats in alkalischer Reaktion hergestellt. Aus heissem Essigäther umkristallisiert bildete sie nadelige Kristalle. Schmelzpunkt 127°. 13.5 g der Säure wurden im 7fachen Volumen Absolutalkohol gelöst, und trockene Salzsäure wurde ohne Kühlung bis zur völligen Sättigung eingeleitet. Nachdem die Lösung unter verminderter Druck eingedampft worden war, wurde der Sirup in kleiner Menge Äther aufgenommen und mit Petroleumäther versetzt. Der anfänglich als ölige Masse gefallte a,  $\beta$ -Dichloracetyl-diaminopropionsäureäthylester kristallisierte beim Aufbewahren im Eisschrank als rhombische Tafeln. Ausbeute 4.5 g. Schmelzpunkt 88–89°.

Für die Analyse wurde die Substanz bei 61° in Vacuum über  $P_2O_5$  getrocknet.

Analyse: 0.2408 g Substanz lieferte 0.02361 g Kjeldahl-N.

Für  $C_9H_{14}N_2O_4Cl_2$  (285.042) berechnet 9.83% N,  
gefunden 9.80% N.

4.5 g Ester wurden dann in 45 ccm Alkohol, der bei 0° mit Ammoniak gesättigt worden war, gelöst und bei Zimmertemperatur 8 Tage stehen gelassen. Es entstand kein Niederschlag in der Lösung. Die Lösung wurde unter verminderter Druck bei 30° bis zur Trocknenheit verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst und das Verdampfen im Vacuum wiederholt, bis im Destillat mit Nessler's Reagens kein Ammoniak mehr nachweisbar war. Die endliche Lösung säuerte man mit verdünnter Schwefelsäure gegen Kongorot schwach an und schüttelte mit 4.9 g Silbersulfat. Das von Chlor vollständig befreite Filtrat wurde mittels Schwefel-

wasserstoffes entsilbert, und weiter der Schwefelwasserstoff durch Luftleitung, und dann die Schwefelsäure quantitativ mittels Baryts entfernt. Man sättigte das klare Filtrat mit Kohlensäure, engte auf dem Wasserbade unter verminderter Druck ein und fällte das Glycyl-[glycyl-diaminopropionsäureanhydrid]-Carbonat durch Zusatz von Alkohol. Die Substanz konnte aber nicht in kristalliner Form bekommen werden und war hygroskopisch. Ausbeute 1.3 g. Schmelzpunkt 144–145°. Pikrinsäure-Carbonatreaktion war positiv. Für die Analyse wurde das Carbonat bei 100° im Vacuum über  $P_2O_5$  getrocknet.

#### Analyse:

0.25351 g Substanz lieferte 0.06051 g Kjeldahl-N.

0.13691 g Substanz lieferte 0.19853 g  $CO_2$  u. 0.07116 g  $H_2O$ .

Für  $C_7H_{12}N_4O_{8\frac{1}{2}}H_2CO_3$  (231.136)

berechnet 38.94% C, 5.67% H, 24.24% N,

gefunden 39.55% C, 5.83% H, 23.87% N.

#### II. Fermentlösungen.

Alle Fermentlösungen waren dieselben, die in den vorigen Mitteilungen (1933) gebraucht wurden, d. h. Pepsin von Grübner, Erepsin nach Rice und Trypsin und Enterokinase nach Waldschmidt-Leitz.

#### III. Versuchsanordnung.

Der zeitliche Verlauf der fermentativen Hydrolyse wurde an auspipettierten 5 ccm der Versuchslösung durch die Ermittlung der Zunahme des freien COOH mit der alkoholischen Titration nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz gemessen. Alle Versuche bei 37°. PH-Bestimmung elektrometrisch.

#### IV. Ergebnisse.

##### A. Pepsin.

Substrat	0.32050 g	PH 2.14
Wasser	10 eem	
M/10 Glykokoll-HCl-Puffer(5:5)	5 ..	
2% Pepsin	5 ..	
Kein COOH-Zuwachs nach 24 Stunden.		

## B. Erepsin.

Substrat	0.2507 g
Wasser	10 cem
M/10 Phosphatpuffer (1:9)	5 "
Erepsin	5 "

$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \text{PH } 7.78$

Kein COOH-Zuwachs nach 24 Stunden.

Das Substrat selbst war stabil sowohl bei PH 2 als bei PH 8.

## C. Trypsin (nicht aktiviert).

Substrat	0.3550 g
Wasser	10 cem
M/10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	4 "
Trypsin	6 "

$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \text{PH } 8.11$

Zeit in Stunden	4	24
M/5 KOH-Zuwachs in cem	0.06	0.13
Hydrolysengrad	3.1%	6.7%

## D. Trypsin + Enterokinase.

Substrat	0.35443 g
Wasser	10 cem
M/10 Phosphatpuffer (0.5:9.5)	4 "
Trypsin + Enterokinase	8 "

$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \text{PH } 8.09$

Zeit in Stunden	4	24
M/5 KOH-Zuwachs in cem	0.13	0.20
Hydrolysengrad	6.8%	10.4%

## LITERATUR.

Abderhalden, E. u. Schwab, E. (1932): Zeitschr. f. physiol. Chem., **212**, 61.

Ishiyama, T. (1933): Journal of Biochem., **17**, 285.

Matsui, J. (1933): Journal of Biochem., **17**, 163 u. 253.

Miyanoki, Y. (1931): Journal of Biochem., **13**, 398 u. 405.



## STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

### XIX. Observations on Urinary Excretion of Lactic Acid of Scorbutic Guinea Pigs and on Lactic Acid Content in the Blood.

By

JITSUICHI SHIMADA.

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, March 16, 1934)

#### I. THE LACTIC ACID EXCRETION OF SCORBUTIC GUINEA PIGS.

Since Bickel (1924; 1925) has stated that the C/N ration of the urine of animals, fed on vitamin free diets, is increased and that the increase is due to the presence of "dysoxydabler Kohlenstoff" which will be originated from the partially oxidised carbohydrate under anaerobic condition, there are reported some papers upon this problem. Rosenwald (1926) has investigated the lactic acid excretion in dogs fed on vitamin free diets and found that the lactic acid output was increased. The author has concluded that the lactic acid might be a constituent of "dysoxydabler Kohlenstoff" in the urine of the animals fed on diets deprived of all the vitamins. Zilva and his co-worker (1928) have determined the lactic acid content of the urine of normal and scorbutic guinea pigs, and they have reached the result that the lactic acid output in percentage does not show any significant change in the urine of scorbutic animals, because the total daily outputs of urine and of lactic acid run parallel.

I have also determined the lactic acid contents of the urine of nine guinea pigs on diets free from vitamin C, and have attained the following results.

#### *Experimental Methods.*

Guinea pigs, weighing about 500 gms., were used for the present work. The feeding and the collection of urine were just

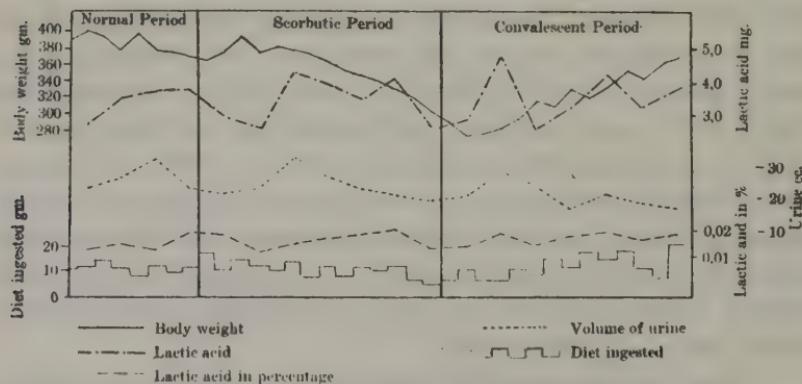
the same as those already stated in previous paper (1934). Endo and Tanaka's method (1927) for the determination of lactic acid in the Urine was employed. As it is necessary that the Urine is free from  $\beta$ -oxybullylic acid for this method, the acid in the Urine has to be tested first by means of Black's reaction (1926). The total lactic acid output in every two day urine of normal guinea pigs was determined four times, and then the same determinations were carried out at the scorbutic period.

### *Experimental Results.*

The results of three guinea pigs out of twelve are shown in the following tables (I, II, and III) and in Figure (1).

As is seen in table I-III and in Fig. 1, the total daily lactic acid output varies widely. The percentage of lactic acid in the urine, however, is almost constant throughout the normal and the scorbutic periods, because total outputs of urine and of lactic acid run parallel. We are unable to observe any significant polyuria even at the end period of scurvy.

Fig. 1. Guinea pig. No. 20.



## II. THE LACTIC ACID CONTENT OF THE BLOOD OF SCORBUTIC GUINEA PIGS.

In the previous paragraph, it was clearly demonstrated that no change could be seen in the percentage of lactic acid in the urine of scorbutic guinea pigs.

TABLE I.  
The lactic acid content of the urine Guinea pig. No. 1.

Date	Experimental period	Body weight	Diet ingested	Volume of urine	Reaction	Specific gravity	Amount of lactic acid in urine	Remarks
11/VII	Normal	510	gm. 35	cm. 32,4	Neutral	1,040	0,0163	mg. 5,30
13	Period	510	28	19,7	Acid	1,036	0,0136	2,68
15	Normal	525	46	23,0	"	1,040	0,0136	3,13
17	Period	535	58	26,4	"	1,040	0,0126	2,82
19		2	550	51	17,6	"	1,044	0,0144
21		4	560	59	31,0	"	1,034	0,0135
23		6	570	57	28,7	"	1,036	0,0125
25		8	565	42	22,2	"	1,044	0,0132
27		10	540	37	21,4	"	1,044	0,0182
29		12	550	40	17,6	"	1,048	0,0133
1/VIII	Deprive	14	535	32	18,6	Neutral	1,036	0,0175
3	Period	16	535	39	21,8	"	1,036	0,0191
5		18	520	30	26,0	Alkaline	1,030	0,0189
7		20	480	10	36,2	"	1,022	0,0121
9		22	445	3	19,8	"	1,028	0,0136
11		24	425	3	7,2	"	1,030	0,0094
13		26	395	5	8,2	"	1,034	0,0121
15		28	350	3	9,8	"	1,030	0,0110

TABLE II.  
Guinea pig. No. 13.

Date	Scorbutic days	Body weight	Diet ingested	Volume of urine	Reaction	Specific gravity	Amount of lactic acid in urine	Remarks
13/VII Normal period	2	gm. 500	gm. 35	ccm. 31.6	Acid	1,036	0,0195	mg. 6,17
	4	470	34	22,4	"	1,040	0,0166	3,72
	6	470	53	22,8	"	1,040	0,0131	2,99
	8	490	50	21,8	"	1,040	0,0195	4,45
	21	505	59	15,2	"	1,042	0,0236	3,58
	23	510	59	23,4	Neutral	1,036	0,0188	4,60
29 Scorbutic period	6	515	57	27,8	"	1,036	0,0192	5,34
	8	520	47	29,0	"	1,036	0,0227	6,58
	10	520	38	30,4	"	1,032	0,0209	6,35
	12	510	34	28,5	Acid	1,032	0,0214	6,10
	14	500	24	29,4	"	1,032	0,0212	6,23
	16	495	30	24,6	"	1,030	0,0161	3,96
1/VIII Normal period	18	460	15	23,4	Neutral	1,034	0,0212	4,96
	20	435	12	32,1	Alkaline	1,032	0,0165	5,30
	22	360	3	19,5	"	1,022	0,0149	2,91
	24							
	26							

TABLE III.  
Guinea pig. No. 20.

Date	Scorbutic days	Body weight	Diet ingested	Volume of urine	Reaction	Specific gravity	Amount of lactic acid in urine		Remarks
							%	mg.	
14/VI	2	400	21	22.8	Alkaline	1.032	0.0125	2.85	
16	4	380	25	25.2	"	1.036	0.0138	3.43	
18	6	375	21	30.2	"	1.030	0.0118	3.56	
20	8	370	24	20.5	Neutral	1.038	0.0182	3.73	
22	2	375	30	18.8	"	1.040	0.0174	2.96	
24	4	375	28	21.2	"	1.038	0.0125	2.65	
26	6	370	26	30.5	Alkaline	1.022	0.0134	4.09	
28	8	355	21	25.0	"	1.030	0.0153	3.83	
30	10	340	22	21.0	"	1.034	0.0162	3.40	
2/VII	12	325	24	19.8	"	1.036	0.0195	3.86	
4	14	290	14	18.6	"	1.038	0.0129	2.40	Diarrhoea
6	2	270	20	20.5	"	1.036	0.0131	2.69	
8	4	280	18	26.2	"	1.032	0.0180	4.77	
10	6	310	22	20.6	"	1.034	0.0115	2.37	
12	8	330	30	18.4	"	1.040	7.0173	3.18	
14	10	340	29	23.5	"	1.040	0.0178	4.18	
16	12	340	31	22.6	"	1.038	0.0125	3.05	
18	14	355	32	21.8	"	1.036	0.0157	3.42	

Further, we have determined the lactic acid content of the blood of scorbutic animals.

#### *Experimental Methods.*

The animals for the present experiment and the mode of the feeding are just the same as in the previous experiment. The blood to be tested is drawn directly from the left ventricle of the heart of animals every other 5 to 6 days, and the blood is inhibited from clotting by potassium oxalate. Takahata and Kume's method (1926) for the determination of lactic acid in the blood is employed. At the end of the experiment, the animals are dissected for proof of scurvy.

#### *Fluctuation of Lactic acid content of the Blood of Normal Guinea Pigs.*

The lactic acid contents of the blood of four normal guinea pigs were determined, the results of which are shown in Table IV.

As is seen in Table IV, the lactic acid content of normal guinea pigs varies to a tolerable extent, i.e., 30 mg/dl in minimum, 76 mg/dl in maximum and 49.8 mg/dl on an average. The average difference in percentage of maximum and minimum values to the average value of the lactic acid content in the blood of normal guinea pigs is +13% and -9.3% respectively. Therefore, it is considered as a real difference when the rates of increase and decrease of the lactic acid content in the blood of scorbutic animals become larger than those of the normal ones.

#### *The Lactic Acid Content of the Blood of Scorbutic Guinea Pigs.*

Now, the lactic acid contents of the blood of nine guinea pigs fed on a vitamin C free diet were determined, and five out of them did not show any difference as compared with the normal ones whereas the four showed a tolerable decrease of the lactic acid content of the blood at the end period of scurvy. The only four out of nine cases were tabulated as shown in Tables V, VI, VII and VIII.

TABLE IV.  
The Lactic Acid Contents in the Blood  
of normal Guinea pigs.

No. of animal	Date	Body wt.	Lactic acid
		gm	mg/dl
26	12/X	490	67.50
	18 ..	480	63.00
	24 ..	470	76.00
	29 ..	460	66.00
	3/XI	460	63.50
	8 ..	485	66.05
27	25/X	505	36.60
	13 ..	510	30.00
	5/XI	475	34.50
	10 ..	505	34.75
	15 ..	490	41.89
	20 ..	505	31.25
28	9/X	560	46.50
	14 ..	505	40.30
	19 ..	500	39.60
	24 ..	540	48.26
	29 ..	540	43.50
	3/XI	555	40.30
29	4 ..	555	58.60
	25/X	550	54.00
	30 ..	545	57.50
	4/XI	545	54.75
	9 ..	555	48.75
	13 ..	655	53.05
	18 ..	555	49.65

It must be noticed that all guinea pigs that showed the decrease are accompanied with fasting. Therefore, I have determined the lactic acid content of the blood of four partially inanitized guinea pigs.

There could be seen, in general, a remarkable decrease in the

TABLE V.  
Guinea pig. No. 31.  
The comparison of blood Lactic Acid Contents in normal and  
scorbutic period of Guinea Pigs.

	Date	Body wt.	Diet ingested	Lactic acid	Remarks
Normal period	24/X	gm 470	gm 12	mg/dl 63.00	
	25	455	10		
	26	450	13		
	27	460	15		
	28	460	15		
	29	460	12		
	30	460	12		
	31	470	19		
	1/XI	470	19		
	2	470	15	70.50	
Scorbutic period	3	460	14		
	4	465	14		
	5	465	15		
	6	480	19		
	7	485	20		
	8	490	16	63.00	
	9	470	12		
	10	455	13		
	11	445	13		
	12	450	17		
	13	445	19	69.25	
	14	440	22		
	15	450	22		
	16	450	22		
	17	455	20		-Diarrhoea
	18	455	15	65.15	
	19	435	18		-Bloody stool
	20	435	17		
	21	420	16		
	22	405	2		
	23	365	2	62.35	

TABLE VI.

Guinea pig. No. 34.

The comparison of blood Lactic Acid Contents in normal and scorbutic period of Guinea Pigs.

	Date	Body wt.	Diet ingested	Lactic-acid	Remarks
Normal period	6/X	gm 585	gm 21	mg/dl 50.50	
	7	575	29		
	8	550	30		
	9	550	26		
	10	550	25		
	11	550	29	61.55	
	12	535	23		
	13	535	21		
	14	540	23		
	15	555	21		
	16	555	24		
	17	550	30		
	18	540	23	51.00	
Scorbutic period	19	545	20		
	20	540	23		
	21	550	24		
	22	530	20		
	23	525	29	62.39	
	24	500	13		
	25	485	24		
	26	470	30		Diarrhoea, Bloody stool
	27	440	30		
	28	395	30		
	29	375	26	50.00	

TABLE VII.  
Guinea pigs. No. 35.

The comparison of blood Lactic Acid Contents in normal and scorbutic period of Guinea Pigs.

	Date	Body wt.	Diet ingested	Lactic acid	Remarks
Normal period	6/X	gm 540	gm 20	mg/dl 49.55	
	7	525	25		
	8	525	20		
	9	515	17		
	10	510	16		
	11	500	12	41.00	
	12	500	8		
	13	480	15		
Scorbutic period	14	465	10		
	15	460	20		
	16	455	18		
	17	440	16		
	18	430	16	45.00	
	19	435	24		
	20	430	30		
	21	425	19		
	22	420	20		
	23	415	18	46.00	
	24	415	22		
	25	405	14		
	26	405	23		Diarrhoea, Bloody stool
	27	395	19		
	28	380	15		
	29	355	14	44.00	

TABLE VIII.  
Guinea pigs. No. 38.

The comparison of blood Laetic Acid Contents in normal and scorbutic period of Guinea Pigs.

	Date	Body wt.	Diet ingested	Laetic acid	Remarks
Normal period	13/X	gm 530	gm 25	mg/dl 37.44	
	14	525	16		
	15	520	24		
	16	510	20		
	17	510	27		
	18	500	25		
	19	520	26	38.50	
Scorbutic period	20	520	29		
	21	520	26		
	22	520	25		
	23	510	27		
	24	515	24		
	25	510	20	34.50	
	26	505	18		
	27	480	18		
	28	465	14		
	29	450	15		
	30	425	17	35.45	Diarrhoea, Bloody stool
	31	410	23		
	1/XI	395	25		
	2	375	10		
	3	370	9		
	4	350	5		
	5	350	1		
	6	335	1	27.35	

lactic acid content of the blood of fasted animals. The representative result was shown in Table IX.

TABLE IX.

No. 42.

The Lactic Acid Contents in the Blood of Partially  
Inanitized Guinea Pigs.

Date	Body wt.	Diet ingested	Lactic acid
15/XI	gm 495	gm 21	mg/dl 49.75
16	500	27	
17	505	26	
18	510	24	
19	505	27	
20	510	25	41.89
21	515	26	
22	515	23	
23	505	14	
24	505	12	
25	510	14	41.25
26	505	12	
27	495	12	
28	480	9	
29	465	9	
30	460	8	43.00
1/XII	455	9	
2	450	8	
3	430	3	
4	420	3	
5	400	2	
6	390	2	33.00

## CONCLUSIONS.

1. There can be seen no increase in the percentage of lactic acid in the urine of scorbutic guinea pigs.
2. We are unable to observe polyuria, which Zilva and his collaborator observed at the end period of experimental scurvy.

3. The lactic acid contents of the blood of normal guinea pigs vary to a tolerable extent; i.e., 30 mg/dl in minimum, 76 mg/dl in maximum and 49.8 mg/dl on an average.

4. The lactic acid content of the blood of guinea pigs fed on a vitamin C free diet does not differ from that of normal ones.

5. There are some guinea pigs that show the decrease of lactic acid content in the blood at the end period of scurvy.

The decrease, however, seems to be due to inanition.

#### REFERENCES.

- Bickel (1924): Biochem. Z., 154.  
Bickel (1924): Munch. Med. Woch., 146.  
Bickel (1925): Klin. Woch., 4, 538.  
Bickel (1925): Mediz. Klinik, No. 29.  
Black (1926): Takahata's Seibutsu-Kagaku-Bunseki.  
Endo and Tanaka (1927): Kanazawa Jiuzenkwai-Zasshi, 32, No. 7.  
Rosenwald (1926): Biochem. Z., 168, 324.  
Shimada, J. (1934): J. of Biochem.  
Shipp, H. L. and Zilva, S. S. (1928): Biochem. J., 22, 408.  
Takahata and Kume (1926): Fukuoka Igakkai-Zassi, 19, 154.

*Additional writing: We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expense of the work, which have been defrayed from Ujun-Kwai.*



## ÜBER DIE REDUKTIONSPOTENTIALE DER ORGANISCHEN VERBINDUNGEN.

VON

J. HIRADE.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Tokyo.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Kakiuchi.)

(Eingegangen am 1. April 1934).

Die Redoxpotentiale verschiedener biologischer Medien und vieler biologisch wichtiger Substanzen sind schon seit vielen Jahren an Hand einer Anzahl von Experimenten gesessen und studiert worden. Was aber die Reduktionspotentiale der reinen Lösungen derjenigen organischen Verbindungen anbetrifft, welch letztere im Stoffwechsel reduzierend wirken, so war es u. a. das Verdienst der Schule Wurmsers (1929/1931), entdeckt zu haben, dass in einer anaerob evoluierten alkalischen Zuckerlösung zwei Redoxsysteme entstehen, welche je bei einem definitiven Potentialniveau reversibel oxydiert oder reduziert werden: das eine rasch reduzierende G'-System mit dem Normalpotential ca. +30 mV. bei 20°, pH 7 und das andere in höherer Konzentration vorhandene, langsam reduzierende G<sub>1</sub>-System mit dem Normalpotential ca. -30 mV. bei 20°, pH 7. Diese beiden Systeme sind dadurch miteinander verbunden, dass G', wenn es einmal durch irgendein Oxydant oxydiert wird, sodann durch G<sub>1</sub> langsam reduziert und reproduziert wird. Die Grenzpotentiale solcher Lösungen, die nach N. Mayer (1929) für alle von ihr verwendeten Zuckerarten unter konstanten Versuchsbedingungen wohl reproduzierbare Werte zeigten, sind wahrscheinlich durch das G<sub>1</sub>-System bestimmbar, während das G'-System in direkter Weise die Elektrode beansprucht. Hiernach ist wohl zu erwarten, dass die Potentiale der verschiedenen organischen Stoffe in wässrigen Lösungen insofern in ihrem Wesen definiert werden können, als sie in oben erwähnter Weise durch reversible Redoxsysteme wie G' und G<sub>1</sub> bestimmbar sind.

Es wäre aber nicht richtig, den Mechanismus der Potentialentstehung für alle beobachteten Fälle und durch die ganzen Mes-

sungszeiten hindurch *einzig* mit der Entwicklung derartiger reversibler Redoxsysteme in Zusammenhang zu bringen. Es liegen in der Tat nicht wenige Fälle vor, in denen die gemessenen Potentiale sog. irreversibler Natur zu sein scheinen. Sind nun solche Potentiale in Wirklichkeit kinetisch durch ein dynamisches Gleichgewicht bedingt oder sind sie nur scheinbar irreversibel und durch ein bisher noch unbewiesenes, besonderes reversibles Redoxgleichgewicht bedingt? Die Lösung dieses Problems scheint bei Aufklärung der Mechanismen der biologischen Redoxpotentiale um so mehr eine ausschlaggebende Rolle zu spielen, als schon bewiesen ermassen einige biologisch wichtige Oxydoreduktionen (Bernsteinsäure-Fumarsäure, Milchsäure-Brenztraubensäure) durch Vermittlung der geeigneten Biokatalysatoren wirklich reversibel verlaufen. Man sieht aber, dass die bisherigen, mehr zerstreuten Tatsachengruppen allzu ungenügend wären, um eine genaue Übersicht, den Mechanismus solcher Potentiale betreffend, erteilen zu können. In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass, wie es aus den zeitlichen Potentialverfolgungen an blanken Platin-, so gut wie an platinierten Elektroden und dem Vergleich der beiden Resultate miteinander, und auch aus den kolorimetrischen Resultaten ersichtlich ist, doch wirklich *ein speziell auf die Metallocberfläche eingestelltes reversibles Redoxgleichgewicht vorhanden sein muss*. Diese Schlussfolgerung, die meiner Ansicht nach fast alle bisherigen Tatsachen wohl zu erklären vermag, stellt das Hauptergebnis meiner Arbeit dar.

### Experimenteller Teil.

#### *Versuchspräparate.*

Die zum Zwecke der Potentialmessungen verwendeten chemischen Präparate waren von folgender Herkunft:

*Formaldehyd.* Reine wässrige Lösungen desselben wurden von reinem Trioxymethylen nach Cambier und Brochet (1894) dargestellt.

*Acetaldehyd.* Wässrige Lösungen desselben wurden aus Aldehydammoniak rein dargestellt.

*Propionaldehyd.* Propionaleohol wurde mittels Chrom-

schwefelsäuremischung oxydiert. Das überdestillierte Propionaldehyd wurde durch noch zweimalige Destillation gereinigt.

*Glykolaldehyd.* Erhitzte man kurze Zeit die nach Fenton dargestellte Dioxymaleinsäure in wässriger Lösung bestimmter Konzentration, so erhielt man durch Kohlensäureabspaltung eine Lösung von Glykolaldehyd in entsprechender Konzentration.

*Glycerinaldehyd.* Reiner Syrup, wurde nach Wohl und Neuberg (1900) aus Akroleinacetal dargestellt.

*Dioxyaceton.* Das Handelspräparat wurde nach H. G. Reeves und E. T. Renbom (1931) mit Aceton 24 Stunden lang geschüttelt und der gewaschene Rückstand aus absolutem Alcohol umkristallisiert.

*Methylglyoxal.* Verdünnte wässrige Lösungen, wovon man nach Neuberg, Färber, Levite und Schwenk (1917) durch Abdestillieren der schwefelsauren Dioxyacetonlösung erhielt.

*Äthylalcohol.* Merck's garantierter Alcohol absolutus wurde nochmals destilliert. Das Destillat erwies sich als ganz aldehydfrei.

*Glykol.* Kahlbaum's Präparat wurde nochmals destilliert.

*Glycerin.* Merck's Glycerin wurde noch einmal in vacuo destilliert.

*Mannit.* Merck's Mannitol wurde zweimal aus wässrigem Alcohol umkristallisiert.

*Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Arabinose, Maltose und Lactose.* Merck's reine Präparate wurden meist einmaliger Umkristallisation unterworfen.

*Glucosamin.* Salzsäures Glucosamin wurde durch die Einwirkung von Salzsäure auf Krebsschalen rein dargestellt.

*Glucoson.* Reine, farblose Glucosonlösungen erhielt man nach E. Fischer (1889) durch Zersetzung von Phenylglucosazon.

*Hexosediphosphorsäureester.* Das im Handel vorkommende Calciumsalz "Candiolin" wurde gereinigt, indem man es kalt auflöste und warm ausschied.

*Neuberg Ester.* Gereinigtes Candiolin wurde nach Neuberg (1918) partiell hydrolysiert und das Ester als Bariumsalz aus Alcohol ausgefällt. Der Aschengehalt des so gewonnenen Präparates (als  $\text{Ba}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) betrug 54.69% (berechn. 54.27%).

*Robison Ester.* Nach Robison und Morgan (1930) wurde aus Hefepreszsaft, Fructose und Phosphat sog. "Soluble B Fraction" isoliert. Diese Fraktion wurde von durch Quecksilberacetat fällbaren Substanzen befreit, dann nochmals durch basisches Bleiacetat gefällt und schliesslich als Bariumsalz wieder aus Alcohol ausgeschieden. Dieses Verfahren wurde noch einmal wiederholt. Der Aschengehalt betrug 53.48% (berechn. 54.27%).

*Glutathion (GSH).* Reine Krystalle desselben wurden nach der einfachen, vorzüglichen Methode von Pirie (1930) aus Hefeextrakt dargestellt.

#### Versuchsmethodik.

Die Potentialmessungen erfolgten auf elektrischen und kolorimetrischen Wegen.

Die Versuchssapparatur zur elektrischen Potentialmessung wurde im grossen und ganzen nach derjenigen konstruiert, derer sich Michaelis und Flexner (1928) bei der Messung des Cysteinpotentials bedient hatten; es sei hier auf ihre Arbeit hingewiesen. Das wesentlichste dieses Apparates besteht nämlich darin, die *vollständige Luftabschliessung des Elektrodenraumes durch Einleitung des vollständig vom Sauerstoff befreiten N<sub>2</sub>-Stroms zu erzielen*, welcher seinerseits durch das langsame Durchleiten des Bombenstickstoffs über genügend lang gestreckte, elektrisch über 600° erhitzte Kupferdrahtnetze erhalten worden ist. Gleichzeitig wurde natürlich für die vollständige Luftpätheit der zu der Apparatur gehörenden Glas-Metall- und Glas-Gummiverbindungen gesorgt. Dass bei solchen Vorrichtungen die Elektrodenlösung frei von jeder Spur von Sauerstoff wurde, konnte dadurch bewiesen werden, dass eine alkalische Pyrogallollösung, die den Elektrodenraum erfüllte, bei ziemlich verstärkter Stickstoffdurchleitung lange Zeit hindurch keine Färbung zeigte.

Für Elektrodenmetalle brauchte man einerseits *platinierete Platin- und Goldelektroden* und anderseits *blanke Platinelektroden*. Man konnte dabei stets den alten, wiederholt gebrauchten Elektroden den Vorzug geben, während neu verarbeitete eine mehr oder minder träge Einstellung und eine schlechtere Reproduzier-

barkeit zeigten und sich somit zu Potentialmessungen als weniger geeignet erwiesen.



Fig. 1. erzielten strengen Anaerobie, die Substratlösung mit der Farbstofflösung und verfolgte den Entfärbungszustand des Gemisches. Dabei wurde aber das Thunberg Röhrchen in etwas modifizierter Form gebraucht, indem man, wie aus Fig. 1 ersichtlich, einerseits die Luftabschliessung durch Quecksilbersiegel (Hg) vervollständigte und anderseits die Farbstoff(F)- und die Substratlösung(S) vor dem Evakuieren in beiden Schenkeln des Gefäßes voneinander trennte.

#### I. DIE RESULTATE DER ELEKTRISCHEN POTENTIALMESSUNGEN.

Es wurden die elektrischen Potentiale der schon vorher genannten zahlreichen organischen Verbindungen in reinen wässrigen Lösungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen gemessen. Die Versuchstemperatur war 38°C. Die Wasserstoffionenkonzentration wurde meist zwischen pH 7 und 12 variiert. Die Konzentration des Substrates war, wenn nichts besonderes vorgeschrieben, stets 0.05 mol pro Liter.

Die erhaltenen Resultate beziehen sich nun erstens je nach der Natur der Elektroden auf die platinierten und auf die blanken Platinelektroden.\*

\* Unter „dem Potential an blanken Elektroden“ verstehe man dasjenige an blanken Elektroden ohne gleichzeitige Anwesenheit der platinierten und unterscheide es vom „Potential an blanken Elektroden bei gleichzeitigem Vorhandensein der platinierten“, da erwiesenermassen die Gegenwart der platinierten Elektroden häufig einen ziemlich erheblichen Einfluss auf die Potentiale an blanken haben.

Zweitens wird das Potentialgleichgewicht im allgemeinen nicht, wie bei üblichen reversiblen Redoxsystemen, in sehr kurzer Zeit hergestellt. Vielmehr braucht man hierzu eine ausgesprochen längere Zeitdauer, die aber je nach den Bedingungen sehr verschieden ist. Daher ist es bei jeder Messung—besonders zum Zwecke der Aufklärung des Potentialmechanismus—ebenso wichtig, zu sehen und miteinander zu vergleichen, in welcher Weise das Potential sich einstellt, wie die Angabe eines definitiven Quasigleichgewichts- bzw. Grenzpotentials. (Unter dem *Quasigleichgewichtspotential* versteht man ein nur für beschränkte Zeit beständiges Potentialgleichgewicht. Demgegenüber nennt man ein für unendlich lange Zeit gültiges Gleichgewichtspotential das *Grenzpotential*. Dass beide im allgemeinen nicht miteinander identisch sind, konnte durch eigene Beobachtungen nachgewiesen werden.)

Auf Grund des oben erwähnten scheint es nunmehr zweckmäßig, die gewonnenen Resultate für die beiden genannten Arten der Elektroden als “*Potentialeinstellung*” und als “*Quasigleichgewichts- bzw. Grenzpotentiale*” getrennt zu betrachten, wie es im folgenden geschehen soll.

### A. Die Potentialeinstellung.

Im allgemeinen gesagt, hängt die Zeitdauer, die das Konstantwerden des gemessenen Potentials erfordert, nicht nur von der Art des Substrates, der Konzentration desselben, dem pH und der Temperatur, sondern auch von der Natur und der Oberflächenbeschaffenheit der Elektrodenmetalle ab. Bezüglich der Veränderungen des Milieus wirken bei ein und demselben Substrat dessen Konzentration, das pH und die Temperatur alle befördernd auf die Potentialeinstellung. *Die Einstellung der Quasigleichgewichtspotentiale sind an platinierter Elektroden meist ausgeprägt rascher als an blanken Elektroden.* Schliesslich hat sich doch noch die Oberflächenbeschaffenheit der Elektrodenmetalle, die ebenfalls häufig einen ziemlich erheblichen Einfluss auf die Einstellung ausübt, selbst bei möglichst konstanten Versuchsbedingungen manchmal als schwer kontrollierbar erwiesen. Ich kann darüber nur beispielsweise sagen, dass die Elektroden, falls sie über einige

Tage hindurch im destillierten Wasser unter atmosphärischer Luft aufgewahrt wurden, häufig eine verzögerte Einstellung aufweisen.

### *I. Einstellung der Potentiale an platinierteren Elektroden.*

Bei den meisten untersuchten Stoffen erwies sich an platinierteren Elektroden die Einstellung des Quasipotentialgleichgewichts weit rascher als bei blankem Platin. Nur bei Hexosephosphorsäureestern, Sulfhydratkörpern und Dioxyaceton resp. Fruktose (beide letzteren bei neutraler Reaktion) war die Einstellung weit trüger und erforderte eine noch längere Zeit als bei blanken Platinelektroden.

Die Einstellungszeit bei 38° betrug je nach der Art des Substrates ganz verschieden—weniger als eine halbe Stunde, einige bis mehrere Stunden oder noch mehr. Im allgemeinen ist das Potential im Beginn der Messung mehr oder minder positiv, wird aber im Laufe der genannten Zeit immer negativer und erreicht asymptotisch einen definitiven Quasigleichgewichtswert.

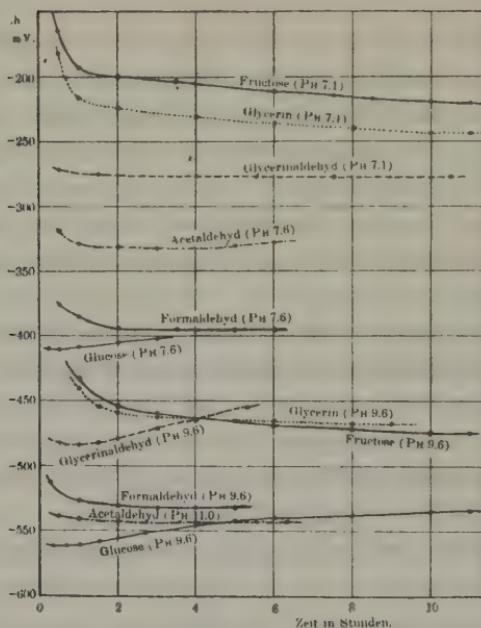
Der Einfluss der Substratkonzentration auf die Einstellung war in messbarem aber nicht in bedeutendem Grade vorhanden.

Die Vergrösserung von PH wirkte auf die Einstellung der Quasigleichgewichtspotentiale zwar begünstigend, aber in ungleich geringerem Grade als im Falle der Grenzpotentiale, welche durch reversible Redoxsysteme im Sinne Wurmsers bedingt sind.

Handelt es sich nunmehr um den Effekt der Natur des untersuchten Stoffes auf die Einstellungsgeschwindigkeit, so erwies sich diese letztere im grossen und ganzen nach der folgenden Reihe geordnet:

D <sub>1/2</sub> Potential wird bei 38°:	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Aldohexosen,} \\ \text{Aldopentosen,} \\ \text{Reduzierende} \\ \text{Disaccharide,} \\ \text{Glucosamin.} \end{array} \right.$	$>$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Einfache Aldehyde,} \\ \text{Oxaldehyde bis} \\ \text{Triosen,} \\ \text{Dioxyaceton in} \\ \text{alkal. Reaktion.} \end{array} \right.$	$>$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Alchole,} \\ \text{Glucoson,} \\ \text{Fructose in} \\ \text{alkal. Reaktion.} \end{array} \right.$	$>$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Hexosephosphor-} \\ \text{säureester,} \\ \text{Sulfhydratkörper,} \\ \text{Fruktose u. Di-} \\ \text{oxyaceton in neu-} \\ \text{tral. Reaktion.} \end{array} \right.$
	$\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$		$\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$		$\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$		$\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$ $\vdots$
meist innerhalb $\frac{1}{2}$ Stunde konstant.	meist in 2–3 Stunden konstant.			Je nach PH in mehreren Stunden oder darüber beinahe konstant.		meist nach über 12–24 Stunden aber die Reproduzierbarkeit ist dabei schlecht.	

Fig. 2. Einstellung der Quasigleichgewichtspotentiale an platinierten Elektroden. (38°, 0.05 m. konz.)



In Fig. 2 sind Beispiele der erhaltenen Resultate graphisch dargestellt, indem die Zeit als Abszissen, das entsprechende Potential  $E_h$  (in Millivolt), bezogen auf die Normalwasserstoffelektrode bei  $\text{pH}=0$ , als Ordinaten eingetragen wurde. An Hand dieser Darstellung werden die oben beschriebenen Ergebnisse sogleich verständlich sein.

In welchem Zusammenhang stehen aber die so gemessenen Quasigleichgewichtspotentiale mit den an blanken Elektroden zu beobachtenden? Dass sie *nicht* Grenzpotentiale sind, erweist sich aus den weiterhin auf noch längere Zeit erstreckten Potentialverfolgungen und besonders deutlich daraus, dass die Einstellung des zweiten Redoxgleichgewichtes (siehe später) durch genügende Temperaturerhöhung beschleunigt werden kann. Es strebt nämlich dieses Quasigleichgewichtspotential, anstatt seine Konstanz auf beliebig lange Zeit zu bewahren, sekundär, wenn auch sehr langsam, wieder der positiven Seite einer zweiten Gleichgewichtslage zu. Die

Geschwindigkeit dieser definitiven Gleichgewichtseinstellung hat sich aber stets viel kleiner gefunden als bei blanken Platin-elektroden.

Hier ein Beispiel. Bei  $38^\circ$ ,  $\text{pH } 9.6$  wird das Quasigleichgewichtspotential von Glucose, wie aus Fig. 2 ersichtlich, in sehr kurzer Zeit auf sein negativstes Niveau eingestellt. Es ist aber als etwas unkonstant erwiesen und beginnt, nach einer Stunde oder mehr, wieder langsam nach der positiveren Seite zu rücken, bis nach mehreren Stunden ein neues Quasigleichgewicht, um etwa 20 millivolt positiver als das zuerst erreichte, festzustellen ist. Hier bleibt das Potential ziemlich beständig. Erwärmt man aber darauf die Messlösung bis etwa  $90^\circ$ , so wird das Potential anfangs wieder negativer, zeigt aber dann ein Minimum (bei ca.  $75^\circ$  z. B.), um schliesslich bei erreichter konstanter Temperatur asymptotisch einem positiveren Grenzwerte zuzustreben (Fig. 3, Kurve C). Kühlt man jetzt die Lösung auf die ursprüngliche Temperatur ab, so nähert sich das Potential, der niederen Temperatur entsprechend, einem noch positiveren definitiven Grenzwerte an. Dieses zweite Gleichgewichtspotential, das den Charakter des Grenzpotentials besitzt, erwies sich bemerkenswerterweise unter sonst gleichen Bedingungen *auf praktisch derselben Höhe gelegen als dasjenige an blanken Platin-elektroden*, nur mit dem Unterschied, dass hier die Potentialeinstellung an platinierteren Elektroden sich stets als bedeutend träger erweist als an blanken. Diese Tatsache konnte an noch anderen Stoffen, die in wässrigen Lösungen reversible Redoxsysteme im Sinne Wurmsers verschaffen, bestätigt werden.

Auf Grund der oben erwähnten Tatsachen ist man bei platinierteren Elektroden imstande, an ein und derselben Lösung das Quasigleichgewichts- und das Grenzpotential getrennt nacheinander zu messen. Das sieht aus, als ob während der Evolution der Potentialeinstellung deren Mechanismus von der einen zur andern übergegangen wäre, worüber später noch ausführlicher die Rede sein soll.

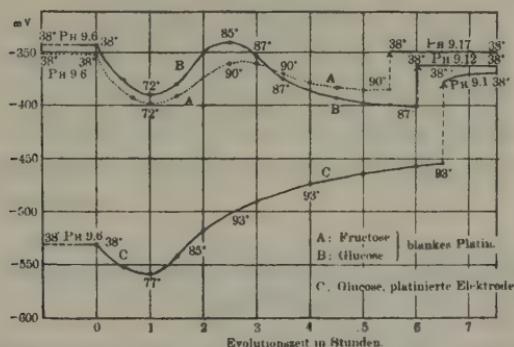
## II. Potentialeinstellung an blanken Platin-Elektroden.

Es wäre zunächst nachdrücklich zu betonen, dass die Potentiale an blankem Platin fast stets qualitativ ein ähnliches zeitliches Verhalten zeigen, wie dies schon im vorigen Paragraphen erwähnt worden ist. In Fig. 4 sind Beispiele der Messresultate an blanken Elektroden zusammengestellt. Vergleicht man sie mit denjenigen in Fig. 2, so ist daraus leicht ersichtlich, dass die Quasigleichgewichtseinstellung hier eine mehr oder minder längere Zeit als bei platinierter Elektroden beansprucht. Bei der grösseren Hälfte der untersuchten Fälle nehmen die Potential-Zeit-Kurven keinen glatten Verlauf, wie es bei der Entwicklung reversibler Redoxsysteme der Fall wäre. Vielmehr weisen sie entweder mehr oder minder ausgeprägte Potentialminima und -maxima auf und streben schliesslich einem definitiven Grenzwerte zu. Oder sie bilden einmal das Quasigleichgewichtspotential aus, das bei Aldosen, Formaldehyd, Robison Ester u.s.w. besonders ausgeprägt ist. Die Potentialwerte, denen die oben genannten Maxima bzw. Minima entsprechen, schwanken aber von Zeit zu Zeit ziemlich beträchtlich und ihre definitive Angabe fällt schwer. Auch die Quasigleichgewichtspotentiale sind als wenig reproduzierbar erwiesen. Nach einem solchen eigenartlichen Verlauf der Potential-Zeit-Kurven strebt das gemessene Potential weiterhin langsam aber andauernd dem definitiven Grenzpotentialwerte zu.

Demgegenüber sind bei einer relativ kleineren Anzahl der untersuchten Fälle, welcher Fructose, Triose, Diose und Sulfhydratkörper gehören, die genannten Maxima bzw. Minima viel weniger ausgeprägt und das Potential läuft annähernd glatt auf das definitive Grenzpotential zu.

Der irreguläre Verlauf der Potential-Zeit-Kurven, wie er schon oben geschildert worden ist, kann dadurch am besten hervorgerufen werden, dass durch eine geeignete Temperaturerhöhung die Einstellung des reversiblen Redoxgleichgewichts und somit des Grenzpotentials beschleunigt wird. Einige Beispiele dafür sind in Fig. 3 als A und B neben der schon auseinandergesetzten Kurve (C) aufgestellt. Es ist nämlich sowohl in Glucose- wie auch in

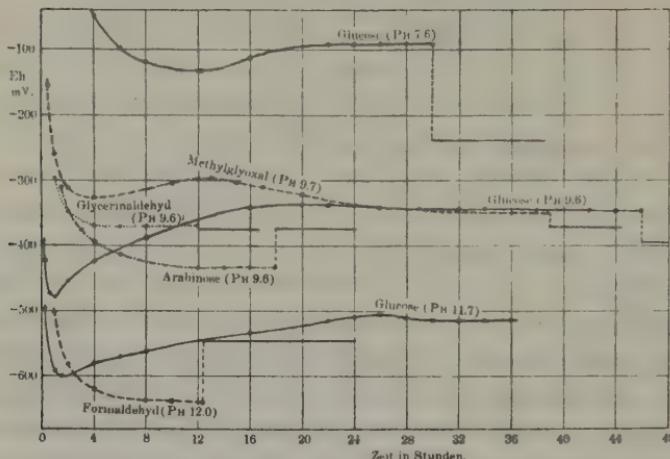
Fig. 3. Verhalten der Reduktionspotentiale bei langsamer Temperaturerhöhung.



Fructoselösung bei  $38^\circ$ , PH 9.6 im Laufe von 24 Stunden oder darüber praktisch das Quasigleichgewichtspotential eingestellt worden. Dabei bleiben die beiden Lösungen aber noch so gut wie ganz farblos, was sich damit erklärt, dass in ihnen, wie aus kolorimetrischen Versuchen ersichtlich, noch keine reversiblen Redoxsysteme im Sinne Wurmsers sich in messbarem Grade entwickelt haben. Erwärmst man sie nunmehr und lässt man sie nach Erreichung der geeigneten hohen Temperatur (etwa  $90^\circ$ ) mehrere Stunden lang bei derselben stehen, so nehmen die Potential-Zeit-Kurven, gleichzeitig mit der Gelbfärbung der Lösungen, in beiden Fällen qualitativ einen ganz ähnlichen Verlauf, indem dabei jenes *Minimum* und *Maximum* nacheinander ganz ausgesprochen in den Vordergrund tritt. Nach Rückkehr auf die ursprüngliche Temperatur findet man, dass die nunmehr beständigen Grenzpotentialwerte—auf dasselbe PH bezogen—in beiden Fällen einander beinahe gleich sind. Dass ein solcher komplizierter Verlauf der Potential-Zeit-Kurven nicht etwa auf die PH-Verschiebung infolge der Säurebildung zurückzuführen ist, kann man vor allem aus der ungewöhnlichen Grösse der Potentialverschiebung im Vergleich mit der des PH sicherstellen.

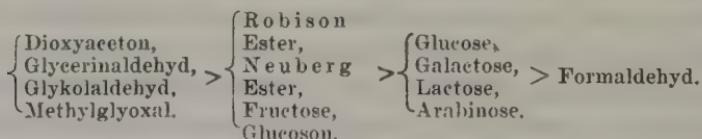
Wie schon vorher erwähnt, steht das auf diese Weisen ermittelte Grenzpotential unter sonst gleichen Bedingungen insofern mit dem an platinierter Elektroden in Übereinstimmung, als es sich um Fälle handelt, wo in der Lösung die reversiblen Redoxsysteme

Fig. 4. Potentialeinstellung an blanken Platin-Elektroden. ( $38^\circ$ , 0.05 m.)  
 Die senkrecht verlaufenden gestrichelten Linien bedeuten eine durch Temperatursteigerung herbeigeführte beschleunigte Einstellung des Grenzpotentials, auf das Initial-PH korrigiert.



im Sinne Wurmsers evoluiert werden.

Handelt es sich schliesslich um den Einfluss der verschiedenen Versuchsbedingungen auf die Einstellung eines solchen Grenzpotentials, so erwies sich dieselbe erstens, je nach der Natur des verwendeten Stoffs, verschieden; sie befindet sich nämlich beinahe in folgender Reihenfolge:



Zweitens ist der Effekt von PH recht beträchtlich gross und zwar ungleich grösser als in Fällen der früher erreichten Quasigleichgewichtspotentiale. So dauerte die Einstellungszeit bei  $40^\circ$  z. B. nach eigenen Messungen bei PH 12 ca. 24 Stunden, nach Wurmser und Geloso (1929) bei PH 10 einen Monat lang und bei PH 7 über ein Jahr lang an.

Drittens wirkt die Temperatur, wie bekannt, nicht weniger kräftig auf die Einstellung als PH ein. So wird bei PH 10 z. B. das Grenzpotential der Glucoselösung bei  $100^\circ$  in 5 Minuten, bei  $84^\circ$  in

einer Stunde und bei  $40^\circ$  in einem Monate erreicht (Wurmser und Geloso).

Aus den bisher erhaltenen Tatsachen können wir schliessen, dass das zeitliche Verhalten des Potentials für die beiden genannten Arten von Elektroden ein einander sehr ähnliches Bild ergibt. Es liegt somit der Gedanke nahe, dass hier auch wie dort zwei ganz verschiedenartige Mechanismen bei der Potentialeinstellung sich nacheinander abspielen.

### B. Die Quasigleichgewichts- bzw. die Grenzpotentiale.

#### I. Die Quasigleichgewichts- und die Grenzpotentiale an platinierter Elektroden.

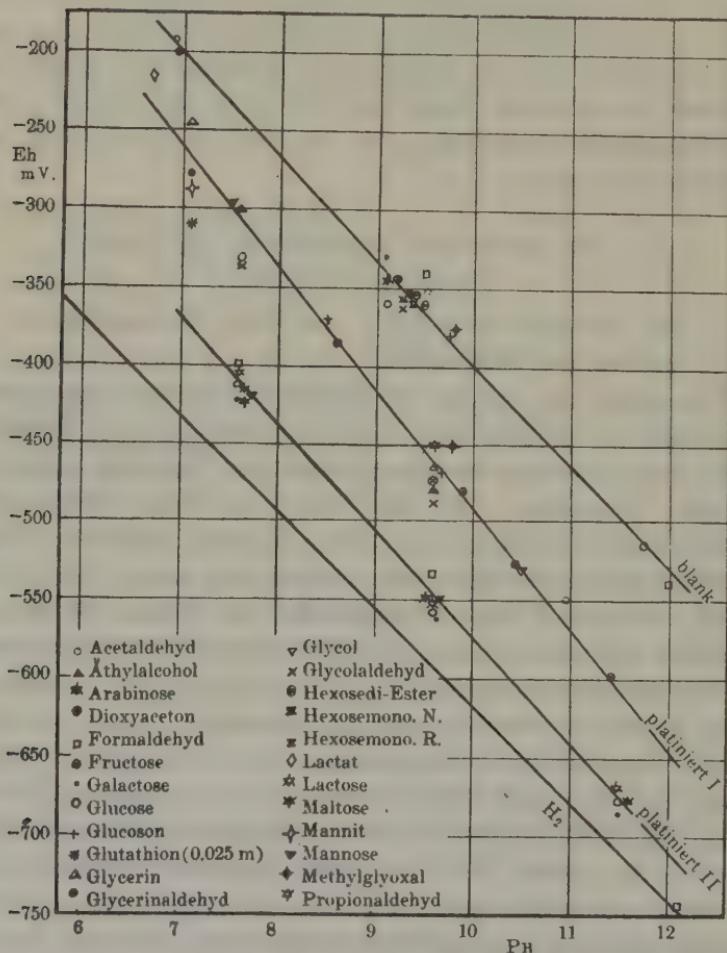
Wie schon im vorigen Abschnitte ausführlich geschildert, liessen sich an platinierter Elektroden bei ein und derselben Lösung zwei verschiedenartige, zeitlich von einander getrennte Potentiale beobachten; und zwar: das in früheren Stadien eingestellte Quasigleichgewichtspotential und das in späteren Stadien eingestellte Grenzpotential. Das letztere aber nimmt, wie bereits erwähnt, wenn auch stark verzögert den blanken Elektroden identischen Wert an, soweit es durch die reversiblen Redoxsysteme im Sinne Wurmsers bedingt ist. Es soll hier daher nur über das erstere Quasigleichgewichtspotential gesprochen werden.

Die Quasigleichgewichtspotentiale der verschiedenen untersuchten Stoffe an platinierter Elektroden sind in Fig. 5 im Zusammenhang mit  $\text{pH}$  aufgestellt worden. Temperatur  $38^\circ$ . Die Konzentration des Stoffes war, falls nichts besonders angegeben, 0.05 mol/Liter. Hieraus ergibt sich die bemerkenswerte einfache Tatsache, dass die meisten untersuchten Stoffe in bezug auf ihr Potentialniveau praktisch in zwei Gruppen zerfallen, wie in Tabelle I gezeigt wird.

Diese Versuchswerte sind als stets von weniger als  $\pm 15$  mV. reproduzierbar erwiesen.

Wie aus derselben Tabelle ersichtlich, sind die untersuchten Aldosen auf annähernd gleichem Potentialniveau gelegen wie Formaldehyd. Dies beruht höchstwahrscheinlich darauf dass

Fig. 5. Quasigleichgewichtspotentiale an platinierten Elektroden und Grenzpotentiale an blanken Elektroden im Zusammenhang mit pH.  
(38°, 0.05 m.)



durch Abspaltung der aus ihnen entstandenen 1,2-Dienole ( $\text{CHOH}=\text{C(OH)}-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$  bei Hexosen z. B.) vielleicht aktive Formaldehydmoleküle an die Elektroden abgegeben werden.

Bezüglich des Einflusses der Konzentration ruft die zehnfache Verdünnung des Stoffes in der Lösung eine positive Potentialverschiebung von etwa  $16 \pm 10 \text{ mV}$  hervor.

TABELLE I.

	1ste Gruppe	2te Gruppe
Dazu gehörende organische Stoffe sind	Acetaldehyd, Propionaldehyd, Glycolaldehyd, Glycerinaldehyd, Dioxyceton, Methylglyoxal, Äthylalcohol, Glykol, Glycerin, Mannit, Lactat, Fructose, Glucoson, etc.	Formaldehyd, Glucose, Mannose, Galactose, Arabinose, Lactose, Maltose, Glucosamin, etc.
Die pH-Potential-Kurve bildet eine Geradlinie, welche bei pH 7 ..... bei pH 10 ..... schneidet.	—262 ( $\pm 25$ ) mV. —493 ( $\pm 25$ ) mV.*	—370 ( $\pm 18$ ) mV. —573 ( $\pm 18$ ) mV.
Mittelwert von $\Delta Eh / \Delta pH$	—77 mV.	—68 mV.

\* Je nach der Stoffart können innerhalb des oben angeführten Potentialbereiches noch feinere Unterschiede in bezug auf das Potentialniveau gemacht werden. So z.B. kommt dem Laetat und dem Methylglyoxal die positivste, dem Glykolaldehyd die negativste Lage in der 2ten Gruppe zu.

Bei Hexosephosphorsäureestern, Sulphydrilkörpern und Dioxyceton resp. Fructose (beide letzteren in neutraler Reaktion) erwies sich nicht bloss die Einstellungträger, sondern auch das erreichte Quasigleichgewichtspotential schlechter reproduzierbar als in den andern Fällen.

## II. Die Quasigleichgewichts- und die Grenzpotentiale an blanken Platin-Elektroden.

Unter exakt gleichen sonstigen Bedingungen schwankten die Quasigleichgewichtspotentiale an blanken Platin wahrscheinlich wegen verschiedener Oberflächenbeschaffenheit der Elektrodenmetalle, immerhin so bedeutend, dass ihre definitive Angabe schwierig fiel, obwohl in einigen Fällen das Quasigleichgewichtspotential sofort einen Wert in der Umgebung des Grenzpotentials annimmt. Hier einige Beispiele:

$$\begin{aligned} \text{Formaldehyd, pH } 12.0, 38^\circ. & \left\{ \begin{array}{l} -590 \text{ mV. (Datum: 29--6-33)} \\ -640 \text{ mV. ( , 4-10-33)} \end{array} \right. \\ \text{Galactose, pH } 9.6, 38^\circ. & \left\{ \begin{array}{l} -450 \text{ mV. ( , 20-6-33)} \\ -340 \text{ mV. ( , 5-10-33)} \end{array} \right. \end{aligned}$$

Demgegenüber erwies sich die Feststellung des Grenzpotentials an blanken Platinelektroden insofern als leicht zugänglich, als sie mit der Entwicklung der reversiblen Redoxsysteme im Sinne Wurmsers verknüpft ist. Es liegen nämlich, wie aus Fig. 5 ersichtlich, unter den untersuchten Stoffen Formaldehyd, Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Dioxyaceton, Methylglyoxal, Glucose, Fructose und noch andere Zucker, Glucoson, Hexosemonophosphorsäureester (Robison u. Neuberg) und Hexosediphosphorsäureester—all diese bilden, wie weiter unten erwähnt, reversible Redoxsysteme—in Zusammenhang mit  $\text{PH}$  praktisch auf einer Geraden, welche bei  $38^\circ$  an  $\text{PH}$  7 resp. 10 das Potentialniveau  $-202(\pm 15)$  mV. resp.  $-400(\pm 15)$  mV. schneidet.  $\Delta E_h / \Delta \text{PH}$  ist  $= -66$  mV. im Mittel, die Gerade verläuft also nur etwas steiler als beim reversiblen  $\text{H}_2$ -Potential. Dieses von mir selbst bei  $38^\circ$  gefundene Resultat stimmt mit dem von N. Mayer bei  $40^\circ$  erhaltenen im allgemeinen sehr gut überein, obwohl den Potentialdaten Mayers zum Teil Quasigleichgewichtspotentiale beigemengt schienen. So wäre meines Erachtens z.B. das von Mayer bei  $40^\circ$ ,  $\text{PH}$  10.1 an Xyloselösung gefundene Potential ein Quasigleichgewichtspotential, aber kein Grenzpotential.

Der Einfluss der Substratkonzentration auf das Grenzpotential war fast stets unbedeutend klein und lag innerhalb der Versuchsfehlergrenzen.

Den Sulphydrilkörpern kommt eine besondere Stellung zu, indem einerseits ihr Potential weitaus negativer liegt und anderseits der Konzentrationseinfluss auf dasselbe viel bedeutender ist als bei andern Stoffen (Gegen zehnfache Verdünnung reagiert das Potential bei  $38^\circ$  um 62 mV. positiver.). Nach eigenen Messungen ist das Glutathionpotential, auf gleiche Konzentration und gleiches  $\text{PH}$  bezogen, nur etwas positiver gelegen als das von Michaelis und Flexner (1928) gemessene Cysteinpotential.

### *III. Die Normalpotentiale der reversiblen Redoxsysteme ( $G'$ ).*

Wir haben im vorigen Paragraphen gesehen, dass manche Aldehyde, alle reduzierende Zucker und Zuckerderivate unter sonst gleichen Bedingungen praktisch dasselbe Grenzpotential aufweisen.

Zugleich konnte man auch beobachten, dass parallel mit dieser Potentialeinstellung jede der genannten Lösungen ein äusserst kräftiges Reduktionsvermögen annimmt, welches höchst wahrscheinlich auf die Entwicklung des G'-Systems von Wurmser zurückzuführen ist. Das Normalpotential von G' aus Glucose resp. Fructose ist schon von Wurmser und Geloso (1929) ermittelt worden. Daher scheint es hier geeignet, und vom biologischen Standpunkte aus sogar sehr interessant, die Normalpotentiale der noch anderen im G'-System abgeleiteten Stoffe zu messen und miteinander zu vergleichen.

Zu diesem Zwecke verfuhr man nach der Methode der "*raschen elektrometrischen Titration*", welche Wurmser und Geoloso schon bei der Bestimmung des Normalpotentials des in evolierter Glucoselösung enthaltenen G'-Systems angewandt haben. Es wurde nämlich jeder der in Frage kommenden Stoffe (siehe oben), nachdem er in heisser alkalischer Lösung evoluiert worden war, unter den folgenden Bedingungen der elektrometrischen Titration unterworfen:

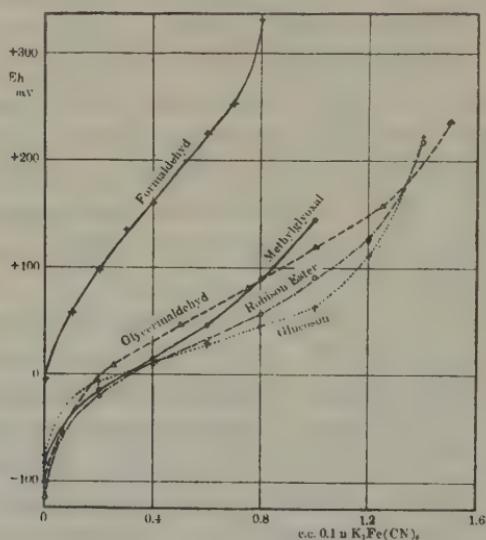
Temperatur 25°, PH 7.2 (stark gepuffert), Tot. Vol. 20 cc. Titration mit zumeist 0.1 norm. Ferricyanidlösung als Oxydant. Die Konzentration des angewandten Stoffes variierte zwischen 0.05 und 0.4 mol/lit. Titrationsintervalle: 2–4 Minuten.

#### Titrationsresultate.

In Fig. 6 sind wichtige Beispiele der so gewonnenen Titrationskurven zusammengestellt. Wie daraus ersichtlich, gelang es bei jedem der untersuchten Stoffe, eine S-förmige Titrationskurve zu erhalten, welche aber mehr oder minder asymmetrisch verläuft. Diese Asymmetrie spricht wahrscheinlich dafür, dass in der titrierten Lösung fortwährend die Rückbildung von G' erfolgt. Diese Rückbildung tritt aber gemäss der reversiblen Natur der Reaktion gerade in der Nähe des Titrationsendes besonders stark hervor.

Auf Grund der obigen Tatsachen scheint es schwieriger, den Titrationsendepunkt definiert anzugeben. Da aber fast jede Titrationskurve in ihrem mittleren Teil praktisch eine gerade Linie bildet, kann derjenige Punkt, wo die Kurve diese Gerade in mess-

Fig. 6. Rusehe elektrometrische Titration der evoluierten Lösungen,  
(25°, PH 7.2)



barem Grade im positiven Sinn zu verlassen beginnt, annähernd als Titrationsendpunkt bezeichnet werden. Hieraus lässt sich das Normalpotential, das 50-prozentiger Oxydation resp. Reduktion entspricht, graphisch ermitteln. Die auf diese Weise gefundenen Normalpotentiale ergeben sich annähernd wie folgt:

TABELLE II.

Temp. 25°, PH 7.2.	
Formaldehyd	ca. +150 mV.
Glucose, Fructose, Galactose, Arabinose, Lactose, Glycerinaldehyd, Dioxyaceton, Glykolaldehyd.	+50 ( $\pm 10$ ) mV.
Glucoson	+20 mV.
Robison Ester*, Neuberg Ester*.	+10 ( $\pm 5$ ) mV.
Methylglyoxal	$\pm 0$ mV.

\* Bei Evolution in heißer alkalischer Lösung erwies sich in beiden Fällen die hydrolytische Phosphorsäure- und freie Zuckerabspaltung als fast unvermeidlich. Sie konnte aber, indem man sich vor unnötig langer Erwärmung

Was schliesslich den Mechanismus der Grenzpotentiale jeder der obigen Lösungen anbetrifft, so steht es nach den oben beschriebenen Beobachtungen fast zweifellos fest, dass *solche Grenzpotentiale in ganz analoger Weise, wie schon von Wurmser und Geloso angenommen wurde, durch thermodynamisch wohl definierbare reversible Redoxsysteme wie G' und G<sub>1</sub> bedingt sind.*

#### *IV. Die Quasigleichgewichtspotentiale an blankem Platin bei gleichzeitigem Vorhandensein von platinierter Elektroden in derselben Lösung.*

Bei Potentialmessungen unter verschiedenen Bedingungen wurde gefunden, dass das Quasigleichgewichtspotential (niemals aber Grenzpotential!) an blanken Elektroden bei gleichzeitigem Vorhandensein von platinierter in der Lösung manchmal derart beeinflusst wird, dass es sich mehr oder minder schneller, und zwar auf ein negativeres Niveau, einstellt als in Abwesenheit der platinierter. Dies tritt besonders ausgeprägt bei Aldosen und—die neutrale Reaktion bevorzugt—Acetaldehyd, Glycerin, u.s.f. hervor, so etwa wie folgt: Das Quasigleichgewichtspotential von *Glucose* z. B. wird an blankem' Platin bei gleichzeitigem Vorhandensein von platinierter Elektroden, neutral so gut wie alkalisch, bei 38° innerhalb mehrerer Stunden eingestellt und nur um ca. 20 mV. positiver gelegen als das an platinierter, während es für sich allein meist erst in über 24 Stunden erreicht wird und dann überdies einen unvergleichbar positiveren Wert besitzt. Bei hütete, bis auf einige Prozente unterdrückt werden. Der Vergleich des Hydrolysengrades mit der Menge des entwickelten G'-Systems belehrte dahin, dass dieses System nicht etwa von den hydrolytisch abgespaltenen Zuckermolekülen herrühre. Zudem machte die Tatsache, dass das Normalpotentialniveau des Robison bzw. Neuberg Esters sich in ausgeprägter Weise von dem des Glucose, Fructose, Triose, etc. unterscheidet, die Annahme sehr wahrscheinlich, dass G' hier aus einem phosphorhaltigen aktiven Körper bestehe. In der Tat bemerkte man auch, dass das Normalpotential eines solchen G'-Systems sich demjenigen von freiem Zucker stark annäherte, wenn durch Verlängerung der Evolutionszeit der Hydrolysengrad des Esters erheblich gesteigert wurde. Bei Hexosediphosphorsäure schreitet andererseits, während der zugehörigen Evolution, die partielle Dephosphorierung so stark fort, dass es schwierig wäre zu entscheiden, ob das entwickelte G'-System von dem Diester an sich oder von dem abgespaltenen Monoester in der obigen Weise herrührt.

*Acetaldehyd, Glycerin u.s.f.* erreicht das Potential in gleichzeitiger Gegenwart der platinierten Elektroden schon nach ca. 10 Stunden  $-100$  mV. bei PH 7, ungleich schneller und ungleich negativer also als bei Abwesenheit derselben in der Lösung. In den andern untersuchten Fällen ist ein derartiger Einfluss teilweise in unbedeutenderem Grade vorhanden, während er teilweise nicht nachgewiesen worden ist.

Diese Befunde spielen meiner Ansicht nach bei der Aufklärung des Mechanismus der Quasigleichgewichtspotentiale eine nicht unwichtige Rolle, wie später ausführlicher mitgeteilt werden soll.

#### V. Der Einfluss des Zusatzes des direkten Dehydrierungsproduktes auf das Quasigleichgewichtspotential.

Es ist eine schon bekannte Tatsache, dass das Cystein- bzw. Glutathionpotential von der Konzentration des Cystins bzw. des oxydierten Glutathions unabhängig ist. In dieser Beziehung konnte ich auch bei andern Stoffen das Analogon finden, indem beispielsweise das gut reproduzierbare Quasigleichgewichtspotential von *Formaldehyd* bzw. von *Acetaldehyd* an platinierten Elektroden durch Zusätze von Formiat bzw. von Acetat nicht messbar verändert wird. Dabei hat man wohl zu beachten, ob diese Carbonsäuren an sich unter gleichen Bedingungen eine geringere Elektronegativität als die zugehörigen Aldehyde besitzen. In der Tat ergab sich, dass das Formiat bei PH 7 und 0.05 m. Konzentration etwas mehr als 50 mV. elektropositiver ist als Formaldehyd. Das Acetat hat sich, sowohl an blanken wie auch an platinierten Elektroden, als ganz elektroinaktiv erwiesen.

Anders in den Fällen, wo das zugehörige Dehydrierungsprodukt mehr oder minder elektronegativer als das Substrat ist. Fügt man beispielsweise einer im Potentialgleichgewicht sich befindlichen Glycerinlösung eines der direkten Dehydrierungsprodukte Glycerinaldehyd hinzu, so verändert sich das Potential nicht nur nicht, wie es der Fall wäre, wenn das Redoxgleichgewicht: Glycerin  $\rightleftharpoons$  Glycerinaldehyd im üblichen Sinne reversibel wäre, auf die positive Seite hin, sondern es ist vielmehr zu beobach-

ten, dass nun das negativeren Aldehydpotential in den Vordergrund tritt und das Alcoholpotential verdeckt.

#### *VI. Der Einfluss der geringfügigen Zusätze einiger anderer reversibler Redoxsysteme auf die Potentialwerte.*

Derartige Untersuchungen scheinen für die Erforschung der Mechanismen der Potentialentwicklung von Bedeutung. Betrachten wir zuerst den Einfluss der Zusätze einer kleinen Menge der reversiblen Redoxsysteme auf die *Grenzpotentiale* derjenigen Lösungen, in denen die reversiblen Redoxsysteme im Sinne Wurmsers entwickelt sind. Wie aus den schon erwähnten Titrationsresultaten ersichtlich, reagiert das vorhandene  $G'$ -System sofort auf das zugesetzte Oxydans (Ferricyanid, Methylenblau u.s.f.) und das Potential verschiebt sich dementsprechend etwas im positiveren Sinn. Aber nach geeigneter Evolutionszeit kehrt das Potential schliesslich asymptotisch auf das ursprüngliche Potentialniveau zurück, indem wahrscheinlich das oxydierte  $G'$  durch das  $G_1$ -System rückreduziert wird.

Handelt es sich demgegenüber um das Verhalten der *Quasigleichgewichtspotentiale* gegen Zusätze einer kleinen Menge der reversiblen Redoxsysteme, so erwies es sich an den beiden Arten der Elektroden auffallend verschieden. Setzt man zu einer im Potentialgleichgewicht sich befindlichen Substratlösung eine kleine Menge eines Oxydans, wie Methylenblau oder Ferricyanid, hinzu, so tritt *an blankem Platin* sogleich das Potential des zugesetzten Redoxsystems in den Vordergrund. Mit dem Vollzug der Oxydoreduktion wird es jedoch immer negativer, bis es schliesslich dem ursprünglichen Quasigleichgewichtswerte asymptotisch zustrebt. *An platinierter Elektroden* dagegen reagiert das Quasigleichgewichtspotential auf Zusatz eines beliebigen Oxydans im allgemeinen nur unbedeutend, und es kann jenes hohe Potentialniveau, das dem zugesetzten Redoxsysteme entsprechen würde, niemals beobachtet werden. So führt beispielsweise bei Glucose und Formaldehyd der Zusatz von Ferricyanid oder von Methylenblau in kleiner Menge so gut wie keine Potentialänderung herbei. Bei Acetaldehyd und andern Aldehyden konnte auf den Zusatz von

Ferricyanid zwar eine Potentialsteigerung von höchstens 20 mV. beobachtet werden, aber das Potential kehrte nach Ablauf der Reaktion bald auf den ursprünglichen Wert zurück. Daraus ergibt sich, dass bei platinierteren Elektroden der Reduktionsgrad des zugesetzten Oxydans in der Lösung einerseits und das Potential anderseits miteinander wenig zu tun haben, während bei blankem Platin ein strenger Parallelismus besteht.

## II. DIE RESULTATE DER KOLORIMETRISCHEN MESSUNGEN.

In welcher Beziehung stehen nun die bisher gemessenen elektrischen Potentialdaten mit den kolorimetrischen Resultaten? Um dies zu beantworten, sollen die letzteren Resultate im folgenden kurz besprochen werden.

1. Diejenigen aktiven Lösungen, in denen die reversiblen Redoxsysteme im Sinne Wurmsers entwickelt sind, vermögen, im Einklang mit dem Befunde von Wurmser und Geloso an Glucoselösungen, bei pH 10 zwar das Phenosafranin (Normalpotential = -330 mV., pH 10) vollständig, das Janusgrün (Normalpotential = -410 mV., pH 10) aber niemals vollständig zu reduzieren. Dies spricht durchaus für die elektrometrischen Daten.

2. Diejenigen Lösungen, bei denen keine reversiblen Redoxsysteme im Sinne Wurmsers in messbarem Grade entstehen, wie es z.B. bei einigen Alcoholen beobachtet wird, zeigen an blankem Platin zwar ein ziemlich niedriges Grenz- bzw. Quasigleichgewichtspotential (etwa -300 bis -350 mV. bei 38°, pH 10), können aber nicht einmal das Methylenblau reduzieren.

3. Die ausgeprägte Elektronegativität der verschiedenen untersuchten Stoffe an platinierteren Elektroden (Quasigleichgewichtspotentiale) stünde scheinbar mit der Kolorimetrie der Lösung in auffallendem Widerspruch. In Gegenwart einer geringen Menge *Platinschwarz* erwies es sich aber auch in solchen Fällen, dass die Elektro- und die Kolorimetrie insofern miteinander übereinstimmen, als selbst das Janusgrün unter diesen Bedingungen vollständig entfärbt werden konnte.

### Theoretischer Teil.

In den vorhergehenden Abschnitten habe ich mich mit den Potentialmessungen der verschiedenen organischen Stoffe auf elektrischen und kolorimetrischen Wegen beschäftigt. Das Wesentlichste meiner Resultate besteht darin, dass sich in den meisten untersuchten Fällen sowohl an blanken wie auch an platinierter Elektroden zeitlich zwei wesensverschiedene elektrische Potentiale nacheinander beobachtet liessen. Das eine ist das in früheren Stadien eingestellte, von der Elektrodennatur abhängige *Quasigleichgewichtspotential*, das besonders ausgeprägt an platinierter Elektroden auftritt, und das andere, das in späteren Stadien eingestellte, von der Elektrodennatur unabhängige weit beständigeres *Grenzpotential*, das man viel leichter an blanken Elektroden abmessen kann.

Welcher Mechanismus liegt nun den beiden Arten von Potentialen zugrunde? Diese Frage ist bezüglich der Grenzpotentiale schon durch vorhergehende Untersuchungen insofern klargelegt worden, als es sich in den meisten Fällen um diejenigen Stoffe handelt, in deren wässrigen Lösungen die reversiblen Redoxsysteme im Sinne Wurmsers evoluiert werden. In solchen Fällen verhält es sich also höchstwahrscheinlich so, dass das gemessene Grenzpotential durch die reversiblen Redoxsysteme  $G_1$  und  $G'$  in der schon von Wurmser und Geloso beschriebenen Weise bedingt erscheint, wenn auch von der chemischen Natur dieser beiden Systeme noch nichts Sichereres bekannt ist. Betreffend die chemische Konstitution der ascorbinsäureähnlichen  $G'$ -Systeme erinnere man sich aber an die schon geschilderte eigene Beobachtung, dass nicht nur die verschiedenen untersuchten Zucker, sondern auch noch Formaldehyd, Methylglyoxal, Glucoson, Robinson und Neuberg Ester ebenfalls  $G'$ -Systeme erzeugen, deren Normalpotentiale aber, mehr oder minder stark ausgeprägt, voneinander verschieden sind. Hiernach wäre mit Wurmser (1933) anzunehmen, dass sich die  $G'$ -Systeme nicht etwa auf einen einzigen chemisch einheitlichen Körper, sondern vielmehr auf verschiedene Körper mit einer gemeinsamen charakteristischen Mole-

*kularkonstitution beziehen, welch letztere die reversible Oxydoreduzierbarkeit ermöglichen soll.* (Derartige Untersuchungen werden fortgesetzt.)

### Über den Mechanismus der Quasigleichgewichtspotentiale.

So bliebe nunmehr noch die Auflösung des einzig wichtigen Problems, welcher Mechanismus den Quasigleichgewichtspotentialen zugrunde liegt.

Auf Grund des einander ähnlichen Verhaltens der Quasigleichgewichtspotentiale betreffs ihrer Entstehung und ihres Überganges zum Grenzpotential kann man zunächst folgern, dass sich an den beiden Arten von Elektroden derselbe Einstellungsmechanismus abspielt. Es scheint daher zweckmässiger, die Resultate an platinierter Elektroden, die in den meisten Fällen eine weit bessere Reproduzierbarkeit als die an blanken aufwiesen, zuerst in Betrachtung zu ziehen.

Ist das in Frage kommende Quasigleichgewichtspotential irreversibler, kinetischer Natur oder ist es wirklich durch ein reversibles Redoxgleichgewicht bedingt? Folgende Tatsachen sprechen mehr für die Irreversibilität des Potentials:

1. Die an platinierter Elektrode beobachtete ausgeprägte Elektronegativität stimmt mit dem kolorimetrisch gemessenen Reduktionsvermögen des Lösungsbalkens nicht überein.

2. Der Zusatz des direkten Dehydrierungsproduktes übt keinen messbaren Einfluss auf das Potential aus.

Demgegenüber sind die folgenden Tatsachen mehr der reversiblen Natur zuzuschreiben:

1. Das Potential hat sich fast stets als gut reproduzierbar erwiesen.

2. In Gegenwart von Platinschwarz als Katalysator findet sich die Kolorimetrie mit der Elektrometrie im Einklang.

3. Der Zusatz eines anderen reversiblen Redoxsystems in kleiner Menge bewirkt eine nur unbedeutende Potentialänderung.

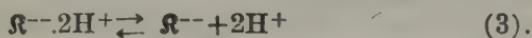
Alle diese Tatsachen lassen sich meines Erachtens durch folgende Annahme besser erklären als durch irgendeine andere:

*Es liegt nämlich ein besonderes reversibles Redoxgleichgewicht vor, welches sich nur an der Metalloberfläche abspielt.*

Man ziehe zuerst den Prozess der katalytischen Dehydrierung durch Metalle in nähere Betrachtung. Die bisher häufig gebrauchte Formel:  $\text{RH}_2 \rightarrow \text{R} + \text{H}_2$  (1), wo  $\text{RH}_2$  ein beliebiger Wasserstoffdonator,  $\text{R}$  sein Dehydrierungsprodukt sei, stellt nur die endgültige Bilanz der Reaktion dar, während in Wirklichkeit die Dehydrierung mehrere Zwischenstufen (2–7) durchläuft. Der Wasserstoffdonator in Form von  $\text{RH}_2$  entspricht der (elektro-) inaktiven ursprünglichen Stufe, in der wahrscheinlich  $\text{R}$  und  $2\text{H}$  einander wie üblich eine homeopolare Bindung eingehen. Er ist in wässriger Lösung in Abwesenheit der Metallkatalysatoren oder der Fermente äusserst beständig und geht im allgemeinen nur ganz schwierig in aktive Form über. In Gegenwart der feinzerteilten Platinmetalle wird die Aktivierung, welche am vollkommensten durch die Formel



ausgedrückt wird, auf ein messbares Geschwindigkeitsniveau beschleunigt, wobei  $\text{R}$  und  $2\text{H}$  durch Vermittlung des Metalls elektrisch disloziert werden.  $\text{R}^{\cdot\cdot}$  und  $2\text{H}^+$  sind nämlich sog. versteckte Ionen (*Ions dissimulés*) im Sinne von G. Urbain (1932) und Wurmser (1933).  $\text{R}^{\cdot\cdot} \cdot 2\text{H}^+$  wird alsdann nach der folgenden Formel in  $\text{R}^{\cdot\cdot}$  und  $2\text{H}^+$  dissoziiert:

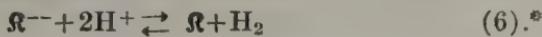


Zugleich aber erfolgt zwischen  $\text{R}^{\cdot\cdot}$  und  $2\text{H}^+$ , welche beiden je das Reduzens und das Oxydans der reversiblen Redoxsysteme nach den Formeln:



und  $2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{H}_2 \quad (5)^*$  ( $e$ : Elektron)

ausbilden, eine Oxydoreduktion, die sich den relativen Potentialhöhen von (4) und (5) entsprechend bis zum folgenden Redoxgleichgewichte führen lässt:



Schliesslich kann das elektroaktive  $\text{R}$  ausserhalb der Metallkataly-

---

\* Nach (5) und (6) scheint es auch möglich, das fragliche Potential einfach, wenn auch oberflächlich, als ein Wasserstoffpotential anzusehen.

satorenoberfläche nach der Formel



in die elektroinaktive Form  $R$  leicht umgewandelt werden. Die Bruttogleichung des ganzen Prozesses ist daher nichts anders als (1).

Unter den oben angeführten Teilprozessen steht es nun ausser Zweifel, dass das reversible Redoxgleichgewicht nach der Formel



dessen Einstellung notwendig mit dem Vorhandensein des Metalls verknüpft ist, das für jede Dehydrierung einzig spezifische und potentialbestimmende Redoxgleichgewicht darstellt. Aus (4) ergibt sich theoretisch die Potentialgleichung

$$E = E_0 + \frac{RT}{2F} \ln \frac{(\mathfrak{R})}{(\mathfrak{R}^{--})} \quad (8),$$

wo  $E$  das Potential,  $E_0$  das Normalpotential des Systems und  $(\mathfrak{R})$  bzw.  $(\mathfrak{R}^{--})$  die Konzentration (oder richtiger: Aktivität) des betreffenden Körpers in der Metalloberfläche bedeutet. Die Grösse  $(\mathfrak{R}^{--})$  und  $(\mathfrak{R})$  können etwa wie folgt berechnet werden: Wenn man von dem Einfluss des Herausdiffundierens von  $\mathfrak{R}^{--} \cdot 2H^+$ ,  $\mathfrak{R}^{--}$ ,  $\mathfrak{R}$ ,  $H_2$ , u.s.f. absieht, so gilt in der Metalloberfläche praktisch die Annäherung  $(\mathfrak{R}) = (H_2)$  (9).

Substituiert man hiermit die aus der Formel (6) abgeleitete Gleichgewichtsgleichung

$$\frac{(\mathfrak{R}) \cdot (H)}{(\mathfrak{R}^{--}) \cdot (H^+)^2} = K \quad (10),$$

wo  $K$  die Affinitätskonstante bedeutet, so ergibt sich:

$$(\mathfrak{R}) = K^{1/2} \cdot (\mathfrak{R}^{--})^{1/2} \cdot (H^+) \quad (11).$$

Anderseits aber steht  $(\mathfrak{R}^{--})$  nach der Formel (2) und (3) mit  $(RH_2)$  der Lösung im folgenden Zusammenhang:

$$\frac{(\mathfrak{R}^{--} \cdot 2H^+)}{(RH_2)} = k \text{ und } \frac{(\mathfrak{R}^{--}) \cdot (H^+)^2}{(\mathfrak{R}^{--} \cdot 2H^+)} = k', \text{ oder}$$

$$(\mathfrak{R}^{--}) = K_1 \frac{(RH_2)}{(H^+)^2} \quad (12), \text{ wo } K_1 = kk' \text{ ist.}$$

Setzt man nun (12) in (11) ein, so ergibt sich für  $(\mathfrak{R})$ :

$$(\mathfrak{R}) = K^{1/2} \cdot K_1^{1/2} (RH_2)^{1/2}. \quad (13)$$

Substituiert man die Gleichung (8) mit (12) und (13), so erhält man

$$E = E'_0 - \frac{RT}{4F} \ln(RH_2) + \frac{RT}{F} \ln(H^+), \quad (14)$$

wo  $E'_0 = E_0 + \frac{RT}{4F} \ln \frac{K}{K_1}$  ist, oder für  $38^\circ$  berechnet, ergibt sich:

$$E = E'_0 - 0.0154 \cdot \log (RH_2) - 0.0617 \cdot PH \quad (15).$$

Diese Theorie der Quasigleichgewichtspotentiale soll im folgenden von verschiedenen Gesichtspunkten aus bekräftigt werden:

1. Die *Messungsresultate an platinierter Elektroden* sprechen für die Näherungsformel (15) ziemlich gut; denn der Einfluss der Substratkonzentration war bei verschiedenen Stoffen innerhalb der Fehlergrenzen in demselben Grade vorhanden wie berechnet, während die PH-Abhängigkeit des Potentials mehr oder minder stärker gefunden wurde als die Theorie es erfordert.

2. Die ganz häufig beobachtete Tatsache, dass das Potential von der Konzentration des Dehydrierungsproduktes ( $R$ ) unabhängig ist, vermag die oben erwähnte Theorie wie folgt zu erklären: Der elektroaktive Dehydrierungskörper  $\mathfrak{R}$  ist schon zur Zeit, wo in der umgebenden Lösung noch keine messbare Spur des inaktiven Produktes  $R$  nachweisbar ist, in nahezu durch Gleichung (13) bedingter, definitiver Konzentration in der Metallocberfläche vorhanden. Aber unter den angestellten Versuchsbedingungen, wo die Geschwindigkeit der Aktivierung:  $R \rightarrow \mathfrak{R}$  wahrscheinlich infolge des *Fehlens eines zweiten geeigneten Katalysators*—z. B. der Fermente (s.u.)—allzu geringfügig ist, wird das zugesetzte  $R$  fast gar nicht zu elektroaktivem  $\mathfrak{R}$  umgewandelt und kann daher die Oberflächenkonzentration des schon vorhandenen elektroaktiven Körpers in keinem messbaren Grade beeinflussen. Die Platinmetalle sind im allgemeinen zur Katalyse der Gleichgewichtseinstellung  $R \rightleftharpoons \mathfrak{R}$  nicht befähigt!

3. Die schon erwähnte Beobachtung, dass in nicht wenigen Fällen das Quasigleichgewichtspotential an blankem Platin sich in Gegenwart der platinierter Elektroden viel schneller und negativer

einstellt als in Abwesenheit der letzteren,\* stimmt mit meiner Aktivierungstheorie völlig überein, wenn man daran denkt, dass das Aktivierungsprodukt von  $\text{RH}_2$ , das sich katalytisch durch die feinzerteilten Metalle gebildet hat, wenn auch ganz spurweise durch Diffundieren auf das blanke Metall gelangt, das für sich allein nur ungleich schwache Aktivierung zeigt, und auch hier das Potential erzeugt. Dass ein solcher Effekt nicht etwa auf den ebenfalls katalytisch gebildeten abführbaren Wasserstoff zurückzuführen wäre, konnte durch die Unabhängigkeit der beobachteten Potentialwerte von der Intensität der  $\text{N}_2$ -Durchleitung bewiesen werden.

4. Es ist leicht verständlich, dass das an blankem Platin gemessene Quasigleichgewichtspotential auf denselben Mechanismus wie bei platinierter Elektroden eingestellt ist. Es wäre dabei auch mit E. Müller (1928) zu erwarten, dass der Aktivierungsgrad auf einfach glatten Platinoberflächen ungleich geringer— $K_1$  der Gleichung (12) also ungleich kleiner—als bei feinzerteiltem Platin schwarz sein würde, was sich bei meiner eigenen Beobachtung darin äussert, dass sich solches Potential bei den meisten  $\text{H}_2$ -Donatoren als weit positiver und viel schlechter reproduzierbar erwies als bei platinierter Elektroden.

5. Die Quastel'sche Theorie der Polarisationsaktivierung (1927), welche die Aktivierung der Substratmoleküle durch die Einwirkung des auf der Enzymoberfläche vorhandenen polarisierenden Feldes annimmt, stimmt mit den oben erwähnten Ansichten überein. Man kann sogar sagen, dass sie, durch meine eigenen Untersuchungen gestützt, eine erweiterte Applikation auf den Mechanismus der Redoxpotentiale finden würde.

6. In einen engen Zusammenhang mit meiner Theorie kann der wohlbekannte Befund von Quastel (1924) und von Thunberg (1925) gebracht werden, dass das Redoxgleichgewicht *Bernsteinsäure-Fumarsäure* in Gegenwart der geeigneten Biokatalysatoren reversibel gemacht werden kann. Nimmt man

---

\* Es sei auf die lehrreiche, und zwar den eigenen Resultaten sehr ähnliche Beobachtung von Biilmann und Klit (1927) hingewiesen, dass kolloidales Palladium als Katalysator für die Einstellung des  $\text{H}_2$ -Potentials an blanken Elektroden wirken kann.

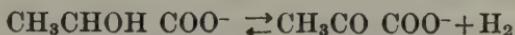
nämlich an, dass nicht nur der im Falle der Metallkatalysatoren beschriebene Dehydrierungsmechanismus auch hierfür gültig ist,\* sondern auch noch der letzte Vorgang:  $\text{R} \rightleftharpoons R$  (7) nur durch Vermittlung der geeigneten Fermente reversibel verläuft, so muss die Oberflächenkonzentration von  $\text{R}$ , anstatt dass sie durch Formel (13) bedingt wäre, nach der Gleichgewichtsgleichung:

$$(\text{R})/(R) = K_2 \quad (16)$$

von der Konzentration von  $R$  direkt abhängen. Hieraus ergibt sich die zu erwartende Potentialformel, im vollständigen Einklang mit der experimentellen, etwa wie folgt:

$$E = E_0 + \frac{RT}{2F} \ln \frac{(\text{Fumarat})}{(\text{Succinat})} \quad (17).$$

In letzter Zeit ist es auch Wurmser und N. Mayer (1933) gelungen, in Gegenwart der Darmbacillenautolysate die Reversibilität des Redoxgleichgewichts *Milchsäure-Brenztraubensäure* nach der Formel:



festzustellen. Auch dieses Resultat wird in derselben Weise zu erklären sein. Es sei zugleich auch auf die Messresultate der Milchsäure-Brenztraubensäure-Potentiale von Banga, Laki und Szent-Györgyi (1933) an Herzmuskeldehydrogenase und von Barron und Hastings (1933) an Gonococcensuspensionen hingewiesen. Unter den drei genannten Schulen stimmen die Potentialdaten im grossen und ganzen so überein, dass das Normalpotential des Systems bei  $38^\circ$ , PH 7 in der Umgebung von  $-200$  mV. liegt. Vergleicht man solche Daten mit den eigenen Resultaten der an platinierter Elektroden gemessenen Milchsäurepotentiale (ca.  $-230$  mV. bei  $38^\circ$ , PH 7), so wird man gleich erwarten können, dass man im Gebrauch von Schwarzelektroden sogar biologisch vor kommende Reduktionspotentiale orientierend ermitteln kann.

Auf Grund der oben angeführten Betrachtungen wäre es

---

\* Gerade in diesem Spezialfall hat sich jedoch die Bernsteinsäure an sich an Metallelektroden als ganz elektroinaktiv erwiesen. Es sind also nicht Metallkatalysatoren, sondern Fermente (oder Cofermente), die die Konstitution wie  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$  aktivieren können.

geeignet, solche Systeme, die nur durch Vermittlung der geeigneten Katalysatoren reversibel oxydiert und reduziert werden, *indirekt reversible Redoxsysteme* zu nennen (sie zeigen das "coupled redox potential" von Baumberger (1933)), und sie den *direkt reversiblen Redoxsystemen* wie G' gegenüberzustellen.

#### KURZE ZUSAMMENFASSUNG.

In den meisten studierten Fällen sind sowohl an blanken wie auch an platinierter Elektroden zeitlich mehr oder minder scharf voneinander getrennt zwei wesensverschiedene elektrische Potentiale zu beobachten. Das eine unbeständige, von der Elektrodennatur abhängige *Quasigleichgewichtspotential*, das in früheren Stadien eingestellt wird, bezieht sich durch die notwendige Vermittlung der Elektrodenmetalle auf das *indirekt reversible (oder semireversible) Redoxsystem*:  $\text{RH}_2 \rightleftharpoons \text{R} + \text{H}_2$ . Demgegenüber misst das andere beständige, von der Elektrodennatur unabhängige, sich später einstellende *Grenzpotential* in üblicher Weise die Intensität der Reduktion der evoluierten *direkt reversiblen Redoxsysteme* im Sinne Wurmser.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. S. Kakiuchi für seine liebenswürdige Anleitung ergebenst danken. Für Unterstützung dieser Untersuchungen bin ich der kaiserlichen Akademie zu grossem Dank verpflichtet.

#### LITERATUR.

- Aubel, E. u. Wurmser, R. (1929): Journ. Chim. Phys., **26**, 229.
- Banga, I., Laki, K. u. Szent-Györgyi, A. (1933): Z. physiol. Chem., **217**, 43.
- Barron, G. u. Hastings, B. (1933): J. Biol. Chem., **100**, 155.
- Baumberger, P., Jürgensen, J. u. Bardwell, K. (1933): J. Gen. Physiol., **16**, 961.
- Biilmann, E. u. Klit, A. (1927): Z. physik. Chem., **130**, 566.
- Cambier, R. u. Brochet, A. (1894): Compt. Rend., **119**, 607.
- Dixon, M. (1927): Proc. Roy. Soc. Lond., B, **101**, 57.
- Euler, H. v., Myrbäck, K. u. Larsson, H. (1933): Z. physiol. Chem., **217**, 1.
- Euler, H. v. u. Klüssmann, E. (1933): ibid., **217**, 167.
- Euler, H. v. u. Martius, C. (1933): Sv. Kem. Tidskrift, **45**, 73; Ann.

505, 73.

- Fenton, H. J. H. (1894/1905) : Journ. Chem. Soc., **65**, 901; **87**, 804.  
Fischer, E. (1889) : Ber., **22**, 88.  
Georgescu, J. D. (1932) : Journ. Chim. Phys., **29**, 217.  
Mayer, N. (1929) : Journ. Chim. Phys., **26**, 565.  
Michaelis, L. u. Flexner, L. B. (1928) : Journ. Biol. Chem., **79**, 689.  
Michaelis, L. (1929) : Oxydations-Reduktionspotentiale, Berlin.  
Müller, E. (7928) : Z. Elektrohem., **34**, 256, 704.  
Neuberg, C., Färber, E., Levite, A. u. Schwenk, E. (1917) : Bioch. Z., **83**, 244.  
Neuberg, C. (1918) : Bioch. Z., **88**, 432.  
Neuberg, C. u. Hofmann, E. (1930) : Bioch. Z., **224**, 491.  
Pirie, N. W. (1930) : Bioch. Journ., **24**, 51.  
Quastel, J. H. u. Whetham, M. D. (1924) : Bioch. Journ., **18**, 519.  
Quastel, J. H. (1926) : Bioch. Journ., **20**, 166.  
Quastel, J. H. u. Wooldridge, W. R. (1927) : Bioch. Journ., **21**, 148, 1224.  
Rapkine, L. (1929) : Compt. Rend., **189**, 171.  
Reeves, H. G. u. Renbom, E. T. (1931) : Bioch. Journ., **25**, 412.  
Robison, R. u. Morgan, G. (1930) : Bioch., **24**, 119.  
Thunberg, T. (1925) : Skand. Arch. Physiol., **46**, 339.  
Urbain, G. (1932) : Compt. Rend., **194**, 1933.  
Wohl, A. u. Neuberg, C. (1900) : Ber., **33**, 3095.  
Wurmser, R. u. Geloso, J. (1928/1929/1931) : Journ. Chim. Phys., **25**, 641; **26**, 424, 447; **28**, 260.  
Wurmser, R. u. De Boe, Z. (1932) : Compt. Rend., **194**, 2139.  
Wurmser, R. u. Mayer, N. (1933) : Journ. Chim. Phys., **30**, 249.





## CONTENTS TO VOLUME 20.

No. 1, July, 1934.

	Page
MAKINO, Hiroshi. Der Einfluss der Temperatur auf den Eiweissstoffwechsel. III. Hexonbasen der Krötenleber während der Winterzeit....	1
ISHIDA, Inao. Über den Calcium- und Phosphorstoffwechsel. II. Einfluss des Carotins und Gallosterins auf den Kalk- sowie Phosphorgehalt des Blutes .....	5
III. Einfluss des Carotins auf den Kalkgehalt in Organen und Geweben	17
YAMAMOTO, Ichiro. Studies on biological reduction. V. The specificity of laetic acid dehydrogenase .....	23
OKII, Isokichi. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese der Phenolschwefelsäure im tierischen Organismus .....	31
OKII, Isokichi. Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXX. Einfluss der Gallensäure auf die Glykogenbildung aus den Fett-säuren in der Leber .....	37
KAWADA, Yutaka. Der Einfluss der Gallensäure auf die Salzauscheidung in der Lebergalle. IV. Ammoniakausscheidung in der Galle bei Zufuhr von Gallensäure .....	43
V. Über die Alkalienausscheidung in der Galle .....	51
OHASHI, Kaname. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. XXXI. Glykogenbildung der Leber bei Zufuhr von Hypophysenextrakt und Cholsäure .....	59
UCHINO, Toyoo. Untersuchungen über den partiellen Abbau des Seiden-fibroins .....	65
TOMIYAMA, Tetsuo and SHIGEMATSU, Shinobu. The rate of libera-tion of amino acids and ammonia in tryptic hydrolysis .....	131
MATSUI, Jujiro. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente .....	141
SHIMADA, Jitsuechi. Studies in experimental scurvy. XIX. Observa-tions on urinary excretion of laetic acid of scorbutic guinea pigs and on laetic acid content in the blood .....	147
HIRADE, Junkichiro. Über die Reduktionspotentiale der organischen Verbindungen .....	161